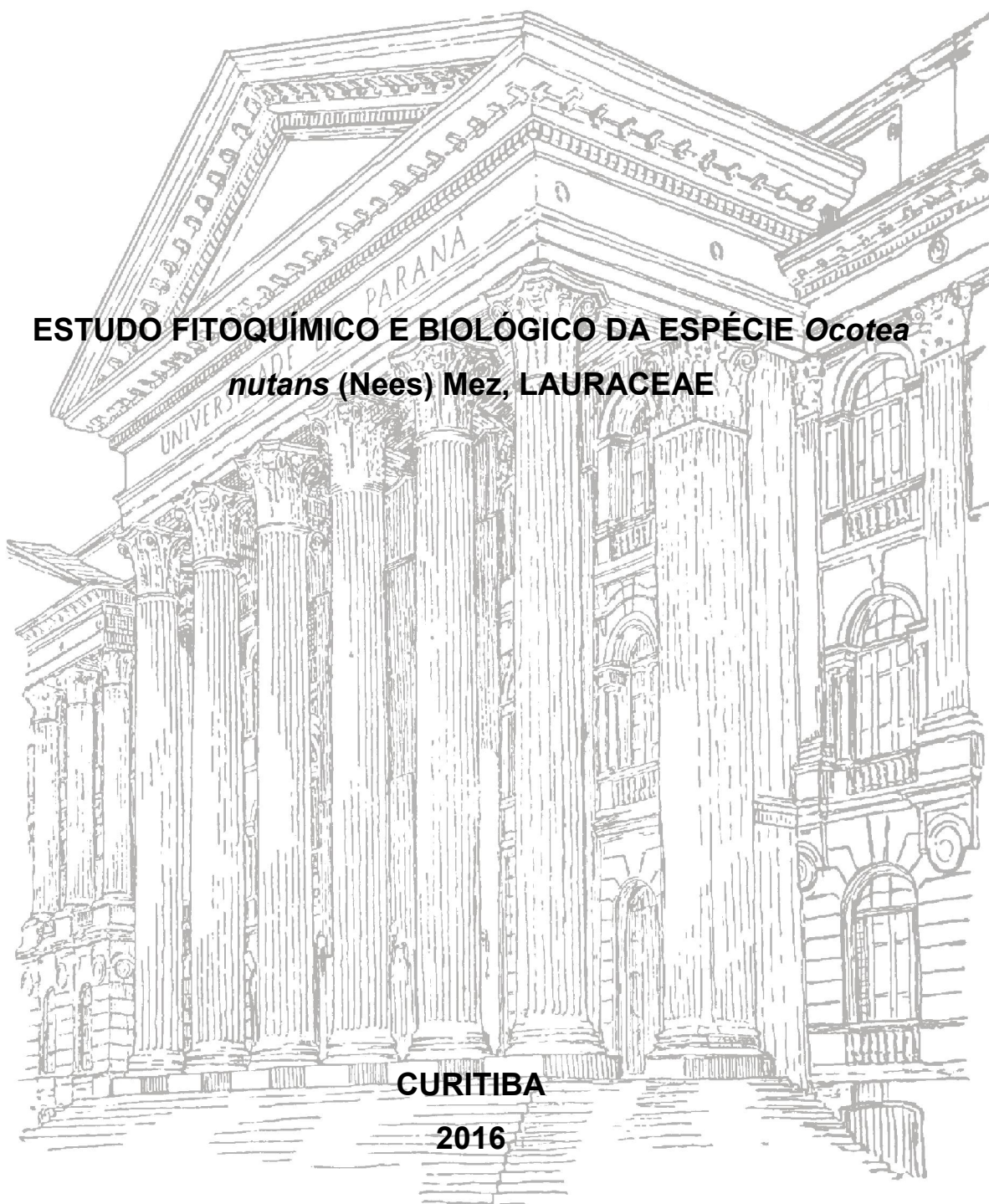


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
FERNANDO CESAR MARTINS BETIM

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DA ESPÉCIE *Ocotea*
nutans (Nees) Mez, LAURACEAE**

CURITIBA

2016



FERNANDO CESAR MARTINS BETIM

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DA ESPÉCIE *Ocotea
nutans* (Nees) Mez, LAURACEAE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dra. Josiane de Fátima Gaspari
Dias

Corientadora: Prof^a Dra. Marilis Dallarmi Miguel.

CURITIBA

2016

Betim, Fernando Cesar Martins
Estudo fitoquímico e biológico da espécie *Ocotea nutans* (Nees) Mez, Lauraceae / Fernando Cesar Martins
Betim - Curitiba, 2016.
102 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Josiane de Fátima Gaspari Dias
Coorientadora: Professora Dra. Marilis Dallarmi Miguel
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Lauraceae. 2. *Ocotea*. 3. Morfologia vegetal. 4. Óleo essencial. 5. Toxicidade. I. Dias, Josiane de Fátima Gaspari. II. Miguel, Marilis Dallarmi. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.


CDD 583.931


TERMO DE APROVAÇÃO


FERNANDO CESAR MARTINS BETIM

**Título: "ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DA ESPÉCIE
Ocotea nutans (Nees) Mez, LAURACEAE"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.


Prof.ª. Dr.ª. Josiane de Fatima Gaspari Dias
Orientadora


Prof.ª. Dr.ª. Sandra Maria Warumby Zanin
Universidade Federal do Paraná


Prof.ª. Dr.ª. Cristiane da Silva Paula de Oliveira
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 05 de agosto de 2016.

Dedico este trabalho aos meus pais (*in memoriam*), João Francisco e Maria Alice.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A minha mãe, pelo exemplo inigualável de pessoa, por sempre apoiar minhas escolhas e decisões e me ensinar a ser sempre forte e não desistir dos meus sonhos. Agradeço pelo tempo que convivi contigo neste plano e pelos ensinamentos que me passou. Se hoje consegui chegar até aqui foi porque tive uma mãe espetacular e sem igual. Você vai fazer falta aqui hoje! Amo você!

Ao meu pai, pela paciência, ajuda e apoio de sempre. Obrigado pelo dom da vida. Você também fará falta aqui hoje.

Aos meus irmãos, Adilson, Gelson e Andréia, pela compreensão, incentivo, ajuda e também por me aturarem e fazer com que meus dias se tornem melhores. Vocês, cada um do seu jeito, são grandes exemplos para mim. Amo vocês!

Aos meus cunhados, Marcos e Angela, que ao longo desses anos me viram crescer e todo o sempre se dispuseram a me ajudar no que eu precisei. Hoje, vejo vocês como anjos nas vidas dos meus irmãos, obrigado por fazerem parte da minha família!

Aos meus sobrinhos, Gabriel e Laura, que eu deposito todo o meu amor. Saibam que é por vocês que eu luto por um mundo melhor. Obrigado por fazer meus dias mais felizes. Lembrar que diante de qualquer dificuldade da vida, olhar para vocês e receber um abraço e um sorriso é o que mais me motiva a viver! Amo vocês, meus eternos pequenos!

Aos meus amigos, em especial Amanda, Cristiane, Isabella, Heloisa, Andressa, Olivia e Franciele, que sempre se dispuseram a me ouvir, assistir meus eternos e incansáveis seminários. Nossa amizade vai além desse mundo. Amo vocês!

A minha amiga de graduação, Susan, hoje companheira de mestrado, pela oportunidade de compartilhar a sua amizade ao longo desses anos e me acompanhar nas loucuras que escolhemos fazer. Amo você!

À Companhia de Saneamento do Paraná, que me permitiu ausentar-se em alguns momentos para a realização deste trabalho, incentivando meu crescimento profissional.

Aos meus (muitos) amigos da SANEPAR, que me cobriram nas atividades rotineiras milhões de vezes, para que meu trabalho fosse realizado e a empresa não tivesse prejuízo com minha ausência. Em especial tenho que agradecer aos amigos, Caroline, Denise, Fernanda, Karine, Neivaldo, José, Jaqueline, Viviane e Ana Maria, que ao longo desses anos me ajudaram a crescer pessoal e profissionalmente. A amizade de vocês é para sempre. Obrigado por tudo!

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

À minha orientadora, Josiane de Fátima Gaspari Dias pelos ensinamentos, paciência, amizade e pelas conversas descontraídas que fizeram com que essa jornada fosse mais fácil.

À minha corientadora, Marilis Dallarmi Miguel pelos ensinamentos, puxões de orelha, paciência, amizade e pelas conversas descontraídas.

Ao Profs. Dr. Obdúlio Miguel, Sandra Zanin e Élide Santos, pelas incansáveis ajudas e ensinamentos, pelas risadas e brincadeiras e a contribuição ao andamento do trabalho.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa, (me perdoem por não citar todos), em especial Camila, Katlin e Paula, por tornarem meus dias mais alegres e tornar o nosso nível de amizade ainda maior!

Ao auxílio da doutoranda Camila Freitas de Oliveira em diversas etapas desse trabalho. Ao Dr. Vinicius Bednarczuk, pela ajuda com a análise de HPLC. A doutoranda Ellis Marina pela ajuda com o ensaio TAS. A doutoranda Angela Maria Souza pela ajuda com o ensaio antimicrobiano. A doutoranda Vanessa Bobek pelo auxílio e correção nas análises morfológicas.

Ao Engenheiro Florestal do Museu Botânico Municipal, Marcelo Leandro Brotto, pela identificação do material botânico. Obrigado também pelas incansáveis ajudas e informações da espécie.

Aos técnicos, Graça e Paulo, pelo auxílio e cordialidade e ao secretário Jean Godoi.

E a todos aqueles que eventualmente não foram citados, mas que, com certeza, participaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho

RESUMO

A espécie *Ocotea nutans* (Nees) Mez, pertencente à família Lauraceae, é encontrada no Paraná sendo endêmica da Floresta Ombrófila Mista. A ausência de trabalhos sobre essa espécie motivou o desenvolvimento desse estudo, que teve por objetivos investigar a composição química desta espécie vegetal verificando suas propriedades biológicas e analisar suas características morfológicas. A caracterização morfológica foi realizada de acordo com metodologia padrão de microscopia ótica e eletrônica. *Ocotea nutans* apresentou folhas lanceoladas e base cuneada em pecíolo. A lâmina foliar apresenta cutícula lisa em ambas as superfícies, estômato paracítico e mesofilo dorsiventral. Não foi observada a presença de tricomas em *Ocotea nutans*, característica diferente ao proposto para Lauraceae. Ao realizar a técnica de microscopia foi observada a presença de diversas células secretoras, o que motivou a busca de óleo essencial nesta espécie e sua identificação. Após a identificação do óleo por CG/EM foram encontrados como compostos majoritários o biciclogermacreno e o D-germacreno, terpenos de mesma origem metabólica. Além do óleo essencial foram utilizados folhas e o caule da espécie para preparo do extrato bruto. Após a obtenção do extrato bruto, este foi fracionado com solventes de polaridade crescente para obter as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e residual. Os extratos e frações obtidos foram submetidos ao ensaio sistemático fitoquímico por CCD elencando os possíveis metabólitos que possam estar presentes na espécie. Os extratos brutos, frações e o óleo essencial foram avaliados em testes de triagem toxicológica *in vitro* e ao ensaio da atividade antimicrobiana pelo método CIM. Após avaliação dos resultados apresentados nos testes escolhidos foi observado que a espécie *Ocotea nutans* possui um potencial tóxico. Merecem destaque os extratos brutos, as frações hexano e o óleo essencial por apresentarem potencial tóxico e perspectivas para o uso em outras atividades biológicas.

Palavras-chave: Lauraceae. *Ocotea*. Morfologia vegetal. Óleo essencial. Toxicidade

ABSTRACT

The *Ocotea nutans* (Nees) Mez, belonging to the Lauraceae family, is found in Paraná being endemic to the Araucaria Forest. The absence of studies on this species motivated the development of this study, in which we aimed to investigate the chemical composition of this plant species checking their biological properties and analyze their morphological characteristics. Morphological characterization was performed according to standard methodology for light and electron microscopy. *Ocotea nutans* presented lanceolate leaves and cuneate base into the petiole. The blade features smooth cuticle on both surfaces, paracitic stomata and dorsiventral mesophyll. It wasn't observed the presence of trichomes in *Ocotea nutans*, different characteristic to the proposed Lauraceae. When performing microscopy technique it was observed the presence of several secretory cells, which led to essential oil search in this species and its identification. After identifying the oil by GC/MS were found to majoritarian compounds bicyclogermacrene and D-germacrene, terpenes of same metabolic origin. Addition to the essential oil, leaves and dry stems were used for the preparation of the crude extract. After obtaining the crude extract, this was fractionated by solvents with increasing polarity to obtain fractions hexane, chloroform, ethyl acetate and residual. The extracts obtained fractions were subjected to phytochemical systematic assay CCD listing the possible metabolites which may be present in the species. And the crude extracts, fractions, and the essential oil were evaluated for toxicological screening tests *in vitro* and testing the antimicrobial activity by the method MIC. After evaluation of the results presented in the chosen testing it was observed that *Ocotea nutans* species has toxic potential. Worth mentioning the crude extracts, the hexane fractions and essential oil for presenting toxicological potential and prospects for use in other biological activities.

Keywords: Lauraceae. *Ocotea*. Plant morphology. Essential oil. Toxicity

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MORFOLOGIA EXTERNA DE <i>Ocotea nutans</i>	23
FIGURA 2 - CICLO DE VIDA DE <i>Artemia salina</i>	26
FIGURA 3 - FOTOGRAFIA DA EXSICATA DE <i>Ocotea nutans</i> (Nees) Mez	28
FIGURA 4 - FLUXOGRAMA DE DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DE MATERIAL E MÉTODOS	30
FIGURA 5 - <i>Ocotea nutans</i> (Nees) Mez	42
FIGURA 6 - <i>Ocotea nutans</i> (Nees) Mez – FOLHA EM CORTE PARADÉRMICO E SECÇÃO TRANSVERSAL	44
FIGURA 7 - PECÍOLO DA FOLHA DE <i>Ocotea nutans</i> (Nees) Mez EM SECÇÃO TRANSVERSAL	47
FIGURA 8 - <i>Ocotea nutans</i> (Nees) Mez – CORTE DO CAULE EM SECÇÃO TRANSVERSAL	49
FIGURA 9 - TESTES HISTOQUÍMICOS DO CAULE DE <i>Ocotea nutans</i> (Nees) Mez	51
FIGURA 10 - TESTES HISTOQUÍMICOS DA FOLHA DE <i>Ocotea nutans</i> (Nees) Mez	52
FIGURA 11 - ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DE <i>Ocotea nutans</i>	59
FIGURA 12 - ESTRUTURA MOLECULAR DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Ocotea nutans</i>	64
FIGURA 13 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS FLAVONOIDES	66
FIGURA 14 - CROMATOGRAMA E ESPECTROS DE UV DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE <i>Ocotea nutans</i>	67
FIGURA 15 - CROMATOGRAMA E ESPECTROS DE UV DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DAS FOLHAS DE <i>Ocotea nutans</i>	68
FIGURA 16 - CROMATOGRAMA E ESPECTROS DE UV DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE <i>Ocotea nutans</i>	68

FIGURA 17 - CROMATOGRAMA E ESPECTROS DE UV DA FRAÇÃO RESIDUAL DAS FOLHAS DE <i>Ocotea nutans</i>	69
FIGURA 18 - CROMATOGRAMA E ESPECTROS DE UV DO EXTRATO BRUTO DO CAULE DE <i>Ocotea nutans</i>	70
FIGURA 19 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE UV DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DO CAULE DE <i>Ocotea nutans</i>	71
FIGURA 20 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE UV DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO CAULE DE <i>Ocotea nutans</i>	71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - TESTES HISTOQUÍMICOS REALIZADOS EM FOLHAS E CAULE DE <i>Ocotea nutans</i>	50
TABELA 2 - ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO MATERIAL VEGETAL.....	53
TABELA 3 - TEOR DE SÓLIDOS DO EXTRATO BRUTO DE <i>Ocotea nutans</i>	54
TABELA 4 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS POR SOXHLET	55
TABELA 5 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS EXTRATOS FRACIONADOS	56
TABELA 6 - COMPOSTOS QUÍMICOS IDENTIFICADOS NA ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO.....	60
TABELA 7 - TEMPO DE RETENÇÃO DOS SINAIS MONITORADOS NAS A ANÁLISES DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DA FOLHA DE <i>Ocotea nutans</i>	65
TABELA 8 - TEMPO DE RETENÇÃO DOS SINAIS MONITORADOS NA ANÁLISE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DE <i>Ocotea nutans</i>	70
TABELA 9 - TOXICIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL EM <i>Artemia salina</i>	73
TABELA 10 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DA FOLHA DE <i>Ocotea nutans</i>	76
TABELA 11 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA(CIM) DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Ocotea nutans</i>	81

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - RELAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DESCRITOS EM PLANTAS DO GÊNERO <i>Ocotea</i>	19
QUADRO 2 - RELAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA/FARMACOLÓGICA REALIZADAS COM PLANTAS DO GÊNERO <i>Ocotea</i>	20
QUADRO 3 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE <i>Ocotea nutans</i> (Nees) Mez	21
QUADRO 4 - TESTES HISTOQUÍMICOS EMPREGADOS NOS CORTES DO CAULE E DA FOLHA DE <i>Ocotea nutans</i>	33
QUADRO 5 - COMPOSIÇÃO DOS SOLVENTES DAS FASES MÓVEIS E REVELADORES DA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA REALIZADA PARA AS FRAÇÕES DE <i>Ocotea nutans</i>	36

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1 - COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO
BRUTO E FRAÇÕES DA FOLHA DE *Ocotea nutans* 77
- GRÁFICO 2 - COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO
BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DE *Ocotea nutans*..... 78
- GRÁFICO 3 - COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO ÓLEO
ESSENCIAL (OE) DE *Ocotea nutans*..... 79

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC –	<i>American type culture collection</i>
CCD –	Cromatografia em camada delgada
CG/EM –	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CIM –	Concentração inibitória mínima
CLAE/DAD -	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector Diode Array
CLSI –	<i>Clinical Laboratory Standarts Institute</i>
CL ₅₀ –	Concentração letal 50%
DMSO –	Dimetilsulfóxido
EBC –	Extrato bruto do caule
EBF –	Extrato bruto da folha
FAA –	Formol, ácido acético glacial, e álcool etílico a 70% (v/v)
FAEF –	Fração acetato de etila da folha
FAEC –	Fração acetato de etila do caule
FCF –	Fração clorofórmio da folha
FCC –	Fração clorofórmio do caule
FHF –	Fração hexano da folha
FHC –	Fração hexano do caule
FRF –	Fração residual da folha
FRC –	Fração residual do caule
MEV –	Microscopia eletrônica de varredura
MHB –	Caldo Muller Hinton Broth
OE –	Óleo essencial
RPM –	Rotação por minuto
SDS –	Dodecil sulfato de sódio
TTC –	Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazólio
UFC –	Unidade formadora de colônia

SUMARIO

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	16
1.1.1	Objetivos específicos	16
2.	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	FAMÍLIA LAURACEAE	17
2.2	GÊNERO <i>Ocotea</i>	18
2.2.1	<i>Ocotea nutans</i> (Nees) Mez	21
2.3	PRODUTOS NATURAIS E A APLICABILIDADE EM ENSAIOS BIOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS	23
2.3.1	Ensaio biológicos e toxicológicos	24
2.3.1.1	Ensaio de toxicidade preliminar em <i>Artemia salina</i>	25
2.3.1.2	Ensaio de atividade antimicrobiana	26
3.	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	MATERIAL BOTÂNICO	28
3.2	ESTUDOS MORFOANATOMICOS	31
3.2.1	Preparo do material vegetal	31
3.2.2	Preparo das lâminas	31
3.2.2.1	Lâminas semipermanentes	31
3.2.2.2	Lâminas permanentes	32
3.2.2.3	Testes histoquímicos	32
3.2.2.4	Microscopia eletrônica de varredura	33
3.4	ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICAS	34
3.4.1	Determinação do teor de umidade	34
3.4.2	Determinação do teor de cinzas totais	34
3.5	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES	34
3.5.1	Obtenção dos extratos brutos	34
3.5.2	Determinação do teor de sólidos totais	35
3.5.2	Obtenção das frações dos extratos brutos	35
3.6	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	36

3.7	EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Ocotea nutans</i>	37
3.7.1	Extração do óleo essencial.....	37
3.7.2	Rendimento do óleo essencial.....	37
3.7.3	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM)	37
3.8	PERFIL DAS AMOSTRAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DIODO (CLAE/DAD).....	38
3.9	ESTUDOS DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	38
3.9.1	Ensaio de toxicidade <i>in vitro</i>	38
3.9.1.1	Atividade tóxica em <i>Artemia salina</i>	38
3.9.1.2	Atividade hemolítica <i>in vitro</i>	39
3.9.2	Avaliação da atividade antimicrobiana	40
3.9.2.1	Micro-organismos	40
3.9.2.2	Determinação da concentração inibitória mínima pela técnica de microdiluição.....	41
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	ESTUDO MORFOANATOMICO.....	42
4.2	ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS	53
4.3	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS DOS EXTRATOS DAS FOLHAS E DO CAULE DE <i>Ocotea nutans</i>	54
4.4	RENDIMENTO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>Ocotea nutans</i>	55
4.5	ANÁLISE DE COMPOSTOS POR CCD.....	55
4.6	ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Ocotea nutans</i>	57
4.6.1	Rendimento do óleo essencial.....	57
4.6.2	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)	57
4.7	PERFIS DAS AMOSTRAS POR CLAE/DAD.....	65
4.8	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	72
4.8.1	Ensaio de toxicidade <i>in vitro</i>	72
4.8.1.1	Atividade tóxica em <i>Artemia salina</i>	72

4.8.1.2	Atividade hemolítica <i>in vitro</i>	74
4.8.2	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	80
5.	CONCLUSÕES	84
	REFERÊNCIAS	86
	ANEXO 1- AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO	98

1. INTRODUÇÃO

As plantas tem sido desde tempos imemoráveis um recurso ao alcance do homem, que busca na natureza meios para melhorar suas próprias condições de vida ampliando consideravelmente as suas chances de sobrevivência, a busca pelo alívio e a cura de enfermidades. As civilizações primitivas observaram a existência de plantas, mesmo que empiricamente, que revelaram o seu potencial curativo. Assim, o uso de plantas tidas como medicinais tornou-se uma estratégia antiga utilizada por praticamente todas as populações do mundo. Registros históricos comprovam que, de início, a informação de plantas medicinais foi transmitida oralmente de geração em geração, para que depois, com o aparecimento da escrita, comesçassem a ser guardadas (MIGUEL; MIGUEL, 2004; DUARTE, 2006).

Antigamente as substâncias procedentes do metabolismo secundário eram denominadas subprodutos, sem importância, do metabolismo primário (GURIB-FAKIM, 2006). Mas, por meio de estudos que avaliaram as rotas biossintéticas elaboradas, foi possível afirmar que os metabólitos secundários são essenciais para a sobrevivência e para a preservação da planta, além de alguns deles serem farmacologicamente ativos (POSER; MENTZ, 2007).

As plantas medicinais são utilizadas amplamente devido aos metabólitos secundários que elas desenvolvem. Essas substâncias ativas podem ser alcaloides, óleos essenciais, flavonóides, compostos fenólicos, entre outros. (KOSEKI et al., 2002).

No contexto dos produtos naturais, o gênero *Ocotea* pode representar uma fonte potencial à descoberta de novos fármacos e/ou ao desenvolvimento de fitoterápicos. Estudos realizados sobre outras espécies deste gênero verificaram concentração significativa de alguns compostos químicos de grande interesse farmacológico e industrial (BARREIRO; BOLZANI, 2009). Dentre eles, lignanas e neolignanas (YOSHIDA; GOTTLIEB, 1989), alcalóides (YOSHIDA; GOTTLIEB, 1989; BARBOSA-FILHO et al., 1999) e óleos essenciais (PINO et al., 2005).

Devido à importância da família Lauraceae, do gênero *Ocotea* e aos poucos estudos realizados com a espécie *Ocotea nutans* (Nees) Mez, este trabalho justifica-se na busca de informações e aspectos diversos, a fim de identificar atividades biológicas da espécie e fornecer dados da composição química e morfológica.

1.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudo fitoquímico e biológico da espécie *Ocotea nutans* (Nees) Mez, Lauraceae.

1.1.1 Objetivos específicos

- Realizar levantamento bibliográfico da espécie *Ocotea nutans*;
- Realizar a análise morfoanatômica do caule, folha e pecíolo da espécie;
- Realizar testes histoquímicos do caule e da folha;
- Obter o extrato cetônico bruto a partir do caule e das folhas secas;
- Realizar o fracionamento dos extratos;
- Realizar estudo fitoquímico da espécie;
- Obter o óleo essencial da espécie e sua identificação;
- Realizar perfil químico das amostras por CLAE/DAD;
- Avaliar o perfil toxicológico da espécie através dos testes *in vitro* em *Artemia salina* e atividade hemolítica do extrato bruto, frações e óleo essencial da espécie;
- Avaliar a atividade microbiológica do extrato bruto, frações e do óleo essencial da espécie;

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMILIA LAURACEAE

A família Lauraceae é pantropical, com poucos membros nas regiões temperadas. A família Lauraceae é considerada uma das famílias botânicas mais complexas da flora brasileira, principalmente no que se refere à taxonomia, devido ao grande número de espécies. O número exato de espécies é desconhecido, mas estima-se que está entre 3000 espécies, as quais são predominantemente arbóreas, ocorrendo principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, estendendo-se a regiões de clima temperado. No Brasil a família Lauraceae é representada por 22 gêneros e aproximadamente 400 espécies (GARCEZ et al., 2009).

Várias espécies medicinais são descritas em Lauraceae, destacando-se as pertencentes aos gêneros *Ocotea*, *Cinnamomum*, *Aniba* e *Nectandra*, as quais apresentam utilização variada, desempenhando diferentes funções contra diversas doenças, tais como antireumática, depurativa, tônico, estomáquico, contra abscessos, empregadas como sudorífico, contra flatulência e, no uso externo, em feridas e úlceras (MARQUES, 2001).

Quimicamente trata-se de uma família rica em metabólitos secundários, destacando-se as neolignanas e lignanas, alcaloides aporfínicos e benzilisoquinolínicos, flavonoides, sesquiterpenos, e pironas (GARCEZ et al., 2011).

A família possui grande importância econômica, com espécies utilizadas na culinária, indústria farmacêutica e química, fabricação de papel e em construção civil. Entre as espécies utilizadas na culinária, pode-se destacar *Persea americana* Mill. (abacate), a espécie *Cinnamomum verum* J. Presl. (canela) e também a espécie *Laurus nobilis* L. (louro) (MARQUES, 2001). O óleo essencial, encontrado em cada espécie da família, tem uso bem difundido na indústria farmacêutica, química e de perfumaria recebendo destaque as espécies *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl, *Sassafras albidum* (Nutt.) Nees, *Aniba roseodora* Ducke (BIZZO et al., 2009).

2.2 GÊNERO *Ocotea*

Espécies do gênero *Ocotea*, um dos mais expressivos da família Lauraceae, apresentam ampla dispersão no território brasileiro (MORAES, 2005). Muitas de suas espécies apresentam interesse econômico de indústrias. No setor de marcenaria tem destaque às espécies provenientes do gênero *Ocotea* como *Ocotea porosa* (Nees & Mart.) Barroso (imbuia), *Ocotea catharinensis* (Mez) e *Ocotea acutifolia* (Nees) Mez. Na indústria química e farmacêutica *Ocotea odorífera* (Vell.) Rohwer teve o uso bem difundido. Outras espécies da família têm apresentado descrição quanto a sua importância econômica tais como *Ocotea puberula* (Rich.) Nees para a indústria de fabricação de papel, e para o setor de construção civil destacam-se as espécies *Ocotea organenses* (Meisn.) Mez, *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez e *Ocotea aciphylla* (Nees) Mez (MARQUES, 2001).

Os representantes deste gênero produzem diversos metabólitos secundários, que podem ser observados no QUADRO 1, destacando-se os alcaloides, lignanas e neolignanas (FUNASAKI et al., 2009; ZANIN; LORDELLO, 2007; SILVA et al., 2002), os quais comumente apresentam diferentes bioatividades, tais como citotóxica (GARCEZ et al., 2011, HOET et al., 2004), anti-inflamatória (ZSCHOCKE et al., 2000), antiprotozoário (FOURNET et al., 2007) e preventivas contra agregação plaquetária *in vitro* (TOGNOLINI et al., 2006) e analgésico (MONTRUCCHIO et al., 2012). Dentre as atividades farmacológicas já encontradas no gênero *Ocotea*, destacam-se a atividade antioxidante (BRUNI et al., 2004) antibacteriana e antifúngica (SOUZA, 2004), relaxante muscular (RIBEIRO et al., 2003), antimalárica (NAPRALERT, 2009). Podem ser observadas algumas atividades biológicas e farmacológicas do gênero *Ocotea* no QUADRO 2.

Vários alcaloides aporfinóides comumente encontrados no gênero *Ocotea* apresentam pronunciadas bioatividades gerando grande interesse por esta classe de compostos e assim alvo de patentes (ZANIN et al., 2011).

Zanin e Lordello (2007) descrevem o gênero *Ocotea* como um promissor potencial de estudo devido aos metabólitos secundários usualmente encontrados.

QUADRO 1 - RELAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DESCRITOS EM PLANTAS DO GÊNERO *Ocotea*

ESPÉCIE	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ISOLADOS
<i>Ocotea macropylla</i>	Alcaloide: (S)-3-methoxy-nordomesticina (PABON; CUCA et al., 2010).
<i>Ocotea puberula</i>	Alcaloides: Ocoteína, dicentrina, predicentrina, N-metil-laurotetanina, isodomesticina, leucoxina, 3-hidroxi dicentrina, N-óxido dicentrina (ARAUJO et al., 2000; ZANIN et al. 2011).
<i>Ocotea longifolia</i>	Sesquiterpenlactona: (+)-longifolina; ocotealactol. Esteroides: sitosterol; sitosterol-3-O-glicosídeo (RODRIGUEZ et al., 2012).
<i>Ocotea leucoxylon</i>	Alcaloides: dicentrina; leucoxilonina; dicentrinona (ZHOU et al., 2000).
<i>Ocotea notata</i>	Flavonoides: protoantocianidina; isoquercetina; miquelianina; afzelina; catequina; kaempferol (GARRETT et al., 2012).
<i>Ocotea minarum</i>	Cumarina: escopoletina. Flavonoides: taxifolina, quercetina-7-O- β -D-glicopiranosídeo Alquil-fenol: 3-(1,4-diidroxipentil)-5-metoxifenol, 5-propilresorcinol, <i>trans</i> -asarona, lioniresinol. Terpeno: ácido lanceólico. Esteroides: β -sitosterol. Alcaloide: triptofol-5-O- β -D-glicopiranosídeo (GARCEZ et al., 2005)
<i>Ocotea duckei</i>	Lignanas fuforânicas: iangambina, epi-iangambina, sesartemina, sesamina, endesmina (BARBOSA-FILHO et al., 1999) Alcaloides: reticulina, coclaurina, N-acetilnorjuzifina (DIAS et al., 2003)
<i>Ocotea suaveolens</i>	Terpeno: ácido 24-hidroxi-tormentico (BEIRITH et al., 1999)
<i>Ocotea heterochorma</i>	Neolignana: biciclo[3.2.1]octano. Flavonoides: afzelina, tamarixetina-3-O-ramnosídeo (LUGO et al., 2015)
<i>Ocotea velloziana</i>	Alcaloides: predicentrina, glaucina, dicentrina, isocoridina, ocoteína, ocopodina, leucoxilonina. Flavonoides: asparagina, p-hidroxibenzil-rutinosídeo (GARCEZ et al., 1995)
<i>Ocotea acutifolia</i>	Alcaloides: dicentrina, ocoteína, leucoxina (GARCEZ et al., 2011; GUTERRES et al., 2013)
<i>Ocotea pulchella</i>	Flavonoide: quercetina (ARAUJO, 2012)
<i>Ocotea lancifolia</i>	Terpeno: espatulenol, 4 β ,5 β ,7 β -eremofil-11-en-10 α -ol (CAMARGO et al., 2013)

FONTE: O autor (2016)

QUADRO 2 - RELAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA/FARMACOLÓGICA REALIZADAS COM PLANTAS DO GÊNERO *Ocotea*

ESPÉCIE	ATIVIDADE BIOLÓGICA/ FARMACOLÓGICA
<i>Ocotea odorífera</i>	Inseticida (JUNIOR et al., 2010) Alelopatia (CARMO et al., 2007)
<i>Ocotea macropylla</i>	Anti-inflamatória (BARRERA; SUAREZ, 2011) Fungicida (PRIETO et al., 2010)
<i>Ocotea puberula</i>	Alelopatia (SILVA et al., 2006) Antinociceptiva (MONTRUCCHIO et al., 2012)
<i>Ocotea longifolia</i>	Inseticida e fungicida (PRIETO et al., 2010)
<i>Ocotea leucoxylon</i>	Anticolinesterásica (YAMAGUCHI et al., 2012)
<i>Ocotea notata</i>	Anti-herpética (GARRETT et al., 2012) Toxicidade (GARRETT et al., 2013) Antimicrobiana (GARRETT et al., 2007)
<i>Ocotea minarum</i>	Genotoxicidade (GUTERRES et al., 2012)
<i>Ocotea duckei</i>	Cardiovascular (BARBOSA-FILHO et al., 2008)
<i>Ocotea quixos</i>	Antibacteriana (BRUNI et al., 2004) Anti-inflamatória (BALLABENI et al., 2010) Antiplaquetária e anti-trombose (BALLABENI et al., 2007)
<i>Ocotea suaveolens</i>	Antinociceptiva (BEIRITH et al., 1999)
<i>Ocotea heterochorma</i>	Toxicidade (CUCA et al., 2009)
<i>Ocotea velloziana</i>	Larvicida (SILVA, 2010)
<i>Ocotea acutifolia</i>	Anestésica (SILVA et al., 2013) Genotoxicidade (GUTERRES et al., 2013) Citotóxica (GARCEZ et al., 2011)
<i>Ocotea pulchella</i>	Antioxidante, citotoxicidade, alelopatia (ARAUJO, 2012)

FONTE: O autor (2016)

A atividade antinociceptiva descrita por Montrucchio e colaboradores (2012) utilizando a dicentrina, um alcalóide aporfinóide, foi alvo de patente. O pedido está depositado no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) sob nº **016339-5 A2** (MIGUEL et al., 2014) de título: “Identificação da propriedade antinociceptiva (analgesica) do alcalóide aporfinico S - (+) – dicentrina e usos do mesmo”.

2.2.1 *Ocotea nutans* (Nees) Mez

Ocotea nutans teve sua classificação botânica e taxonômica descrita por Carl Christian Mez em 1889 (QUADRO 3).

QUADRO 3 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE *Ocotea nutans* (Nees) Mez

TAXONOMIA DE <i>Ocotea nutans</i>	
Reino	Plantae
Divisão	Streptophyta
Classe	Equisetopsida C. Agardh
Subclasse	Magnoliidae Novák ex Takht.
Super ordem	Magnolianaes Takht.
Ordem	Laurales Juss. ex Bercht. & J. Presl
Família	Lauraceae Juss.
Gênero	<i>Ocotea</i> Aubl.
Espécie	<i>Ocotea nutans</i>

FONTE: www.tropicos.org

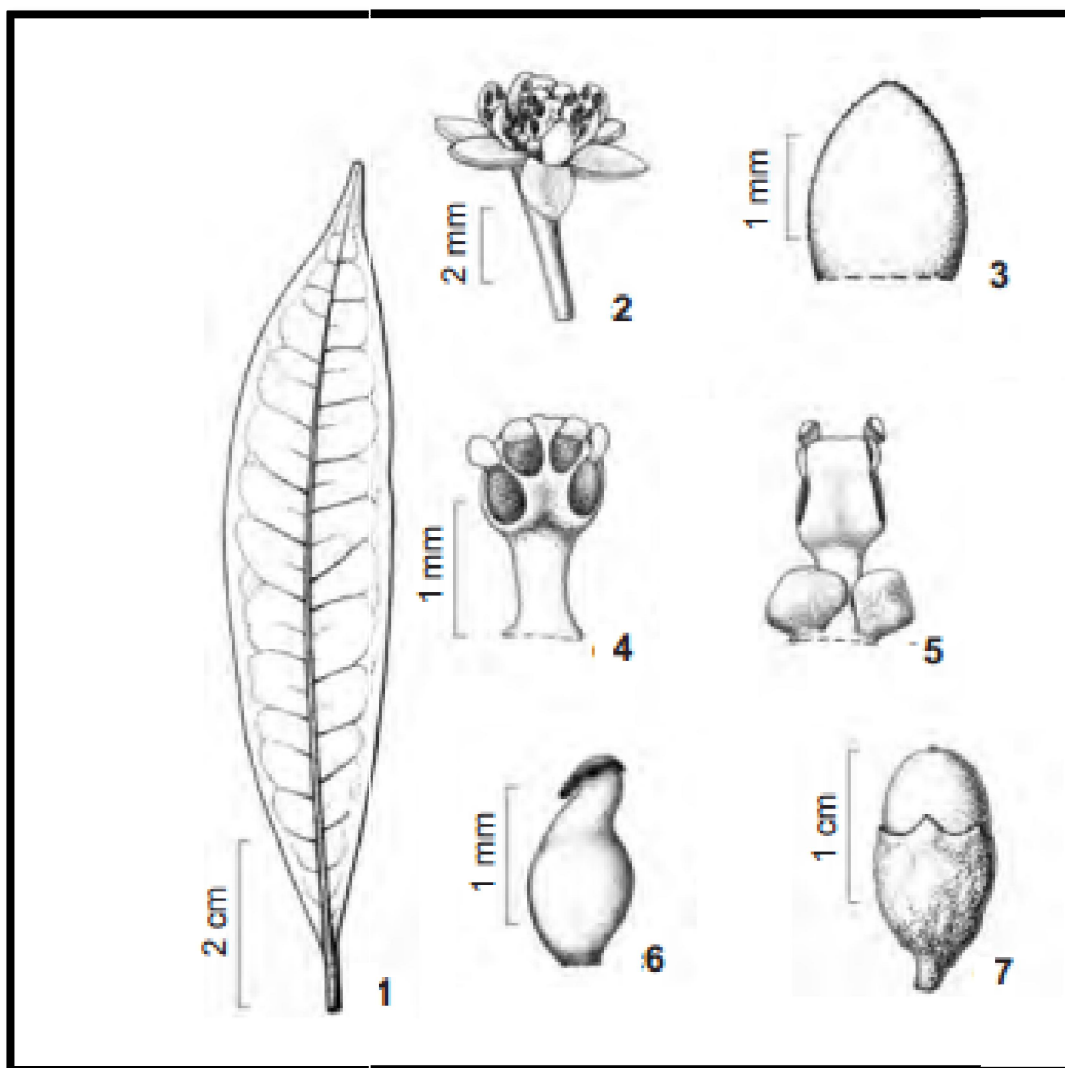
A espécie *Ocotea nutans* é descrita como uma árvore de 30 metros de altura, com ramos cilíndricos, lustrosos, glabros (ausência de pêlos em sua superfície externa). Possuem folhas alternas, lanceoladas, de base cuneada, ápice agudo, nervação broquidódroma e domácias ausentes. A espécie é endêmica do estado do Paraná, encontrada em Floresta Ombrófila Mista (FOM), com concentração de distribuição no primeiro e segundo planalto (BROTTO et al., 2013).

Floresce de fevereiro a junho e frutifica de maio a janeiro. Apresenta flores unissexuadas, sendo a única espécie com flores unissexuadas de ramo lustroso. A coloração das flores é creme e seus frutos são pretos com cúpulas vermelhas (BROTTO et al., 2013).

Apresenta flores glabras em ambas as faces com tépalas ovalado-elípticas, estames das séries I e II com 1,5–1,7 mm comprimento com filetes glabros tão longos quanto as anteras, sendo estas ovaladas de ápice obtuso,

glabras, locelos superiores introrsos e inferiores lateral-introrsos. Estames da série III com 1,6 mm comprimento com filetes glabros tão longos quanto as anteras, estas retangulares de ápice truncado e locelos superiores lateral-introrsos e inferiores lateral-extrorsos. Os estaminódios da série IV estão ausentes; pistiloide filiforme; pistiladas com estaminódios de 0,5 mm comprimento; pistilo de 1,5 mm comprimento, glabro, ovário elipsoide, estilete curto, estigma subcapitado. Os frutos da espécie medem 1,1 × 0,9 cm com características elipsóides e de ápice mucronado (BROTTO et al., 2013). Algumas dessas características seguem evidenciadas na FIGURA 1.

Na literatura, até o presente momento, não há descrição de estudos sobre o perfil químico ou biológico de *Ocotea nutans*, porém, estudos sobre o gênero *Ocotea* têm mostrado a presença de diversos metabólitos secundários (QUADRO 1) e várias descrições de atividades biológicas (QUADRO 2).

FIGURA 1 - MORFOLOGIA EXTERNA DE *Ocotea nutans*.

FONTE: BROTTTO et al., (2013)

NOTA: 1) Folha (face abaxial), 2) Flor, 3) Tépala, 4) Estame série I, 5) Estame série III, 6) Pistilo, 7) Fruto.

2.3 PRODUTOS NATURAIS E A APLICABILIDADE EM ENSAIOS BIOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS

As plantas medicinais são frequentemente usadas como medicamento pela população. O que não se leva em consideração é que o precursor vegetal é um xenobiótico, que apesar de uma finalidade terapêutica específica, sua ação é desconhecida pelo metabolismo do corpo humano. Após formação dos produtos

da biotransformação no corpo humano é que a toxicidade da droga é conhecida e só a partir dessa transformação é que podemos considerar se a terapêutica será segura e eficaz (FRANCO; FRANCO, 2003). Do ponto de vista terapêutico deve-se considerar que uma planta medicinal ou um fitoterápico não devem ter efeitos maléficos e ao longo do prazo se instalem de forma assintomática e sem prejuízos às funções fisiológicas do organismo ou de um sistema biológico (VEIGA-JUNIOR et al., 2005).

A eficácia e a segurança sempre devem ser validadas através de documentação na bibliografia, recentes publicações e se possível, ambas com estudos farmacológicos, biológicos e toxicológicos em acompanhamento (BRASIL, 2013).

Através do conhecimento de doenças e patologias é que ocorre o planejamento de novos fármacos. Nesse sentido, os produtos naturais possuem um papel central em vários processos que visam desde a identificação de substâncias bioativas até sua aplicabilidade em ensaios biológicos pré-clínicos, para que futuramente possam entrar em testes clínicos e ter sua utilização aprovada (AMARAL et al., 2003; BRANDÃO et al., 2010; GUIDO et al., 2010)

2.3.1 Ensaios biológicos e toxicológicos

As técnicas de triagem biológica e toxicológica são importantes para avaliação de precursores vegetais. A aplicação de estratégias visando a identificação de precursores de fármacos torna-se importante no que tange a aplicabilidade em sistemas biológicos, assumindo uma importância fundamental para o entendimento como seletividade, afinidade e especificidade das substâncias vegetais (PUPO et al., 2007).

A fase inicial concentra-se na identificação e otimização de moléculas com potencial de desenvolvimento clínico. Após a otimização do processo de obtenção das moléculas é importante realizar os testes de seletividade a alvos biológicos utilizando técnicas de triagem biológica. Em muitos casos ocorre a ligação da macromolécula ao alvo biológico comprovando sua modulação seletiva ao alvo teste e estabelecendo sua relevância para um possível controle do

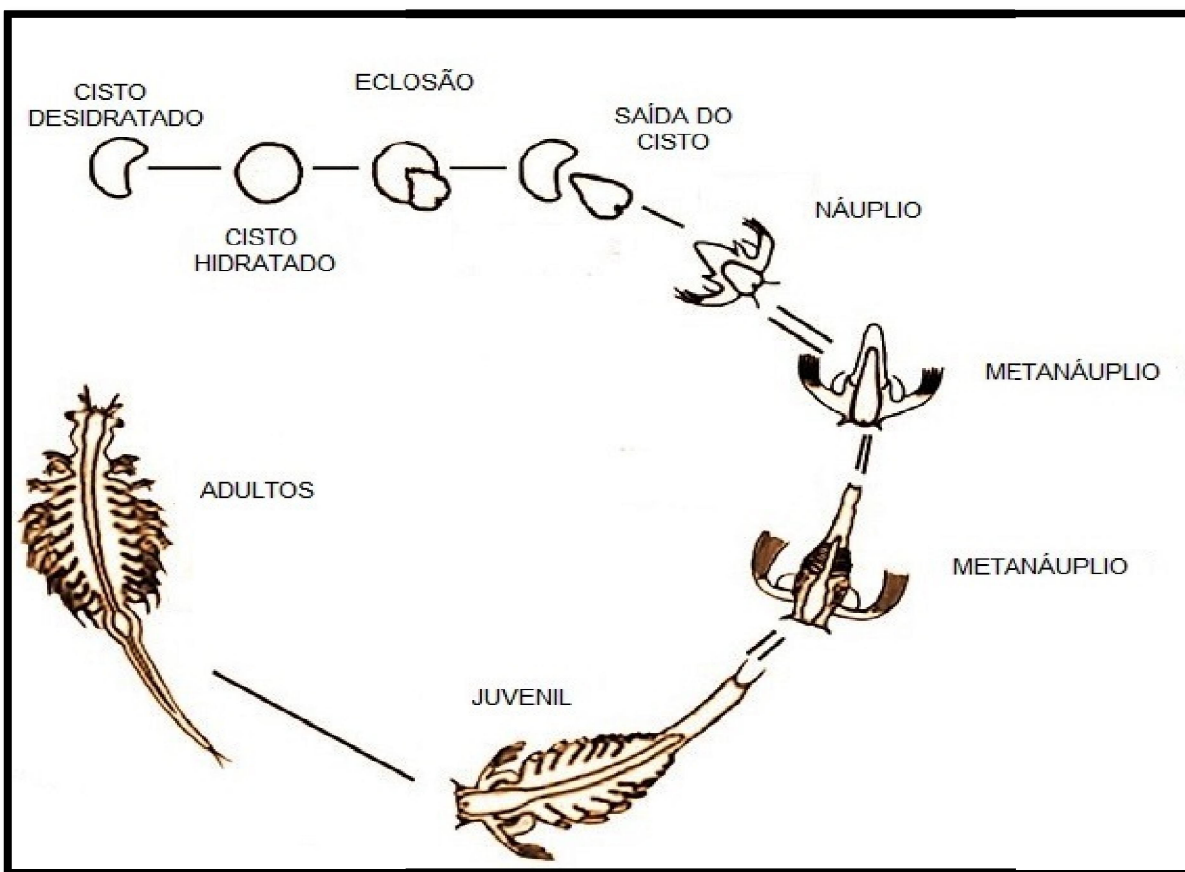
processo fisiopatológico ou na cura de doenças e disfunções (GUIDO et al., 2010). Em alguns casos a macromolécula isolada não apresenta ação desejada, necessitando de sinergismo com algum outro ligante para que a atividade biológica seja relevante (MACIEL et al., 2002; VEIGA-JUNIOR et al., 2005).

2.3.1.1 Ensaio de toxicidade preliminar em *Artemia salina*

Artemia salina (Anostraca) é um microcrustáceo de água salgada, bioindicador de toxicidade e frequentemente utilizado em pesquisas envolvendo produtos naturais, sendo considerado um ensaio de avaliação de toxicidade preliminar. A avaliação de toxicidade é considerada fundamental como bioensaio preliminar no estudo de substâncias com propriedades biológicas (MEYER et al., 1982; ALVES et al., 2000).

Os compostos vegetais são submetidos ao ensaio de toxicidade em *Artemia salina* (TAS), um teste simples e rápido, visando avaliar ou prever efeitos tóxicos nos sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa das substâncias. Em geral, os extratos derivados de plantas com alta toxicidade evidenciada em TAS sugerem alto potencial para atividades biológicas, sendo correlacionado com a atividade contra o *Trypanosoma cruzi* (ALVES et al., 2000) e também com a atividade citotóxica em tumores humanos sólidos (MCLAUGHLIN et al., 1998).

Os cistos de *Artemia salina* são comercializados em lojas de aquários e eclodidos de maneira prática em água marinha artificial. O experimento é simples devido à rápida eclosão dos cistos e seu rápido ciclo de vida (FIGURA 2) até atingir a fase adulta.

FIGURA 2 - CICLO DE VIDA DE *Artemia salina*

FONTE: (MARTIN, 2015)

2.3.1.2 Ensaio de atividade antimicrobiana

Em razão ao aumento da resistência dos micro-organismos às múltiplas drogas antimicrobianas, surge a preocupação e a procura de novas alternativas terapêuticas com as plantas medicinais representando uma importante fonte para obtenção destes medicamentos. A atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais foi comprovada em vários estudos realizados em países que possuem uma flora diversificada (HOLETZ et al., 2002; ADWAN et al., 2008; MULYANINGSIH et al., 2011).

Extratos de plantas têm apresentado além de suas propriedades antibacterianas, a capacidade de interferir na atividade antibiótica e uma forte tendência na potencialização de antibióticos. Esta interação positiva já foi

demonstrada em estudos, muitas vezes com resultados promissores (SOUSA et al., 2011).

Atualmente, há a necessidade de desenvolver agentes antimicrobianos com efeitos potencializadores ou novas alternativas para tratar os micro-organismos resistentes (NEGI; DAVE, 2010). Uma nova forma de terapia seria a utilização dos extratos de plantas bioativas e a associação com antimicrobianos comerciais conhecidos, através de terapia antimicrobiana sinérgica entre agentes utilizados (SARAIVA, 2012).

Os mecanismos de ação de compostos naturais podem agir na desintegração da membrana citoplasmática, desestabilização da força próton motriz, no fluxo de elétrons, transporte ativo e coagulação do conteúdo da célula, rompendo ou desestruturando a parede celular bacteriana (BURT, 2004).

Segundo Ostrosky et al. (2008) para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de extratos vegetais o método mais utilizado é a microdiluição em caldo. O método de microdiluição em tubo é considerado uma metodologia quantitativa, pois ele fornece a CIM frente às amostras testadas, evidenciando qual é a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento da amostra antibacteriana (MURRAY, 1999; ALVES et al., 2008)

O método de microdiluição em caldo utiliza uma placa de fundo em U de 96 cavidades, com volumes de meio de cultura que varia de 0,1 a 0,2 mL. É um método mais sensível que os demais métodos e utiliza pouca quantidade de amostra (OSTROSKY et al., 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BOTÂNICO

A espécie *Ocotea nutans* foi coletada entre os meses de junho e julho de 2015, na cidade de Colombo-PR, próximo as coordenadas 25°17'03,5"S 49°08'44"W. A identificação da espécie vegetal foi realizada por comparação com a exsicata registrada no Herbário UPCB do Departamento de Botânica da UFPR, sob o número 56552 (FIGURA 3).

FIGURA 3 - FOTOGRAFIA DA EXSICATA DE *Ocotea nutans* (Nees) Mez



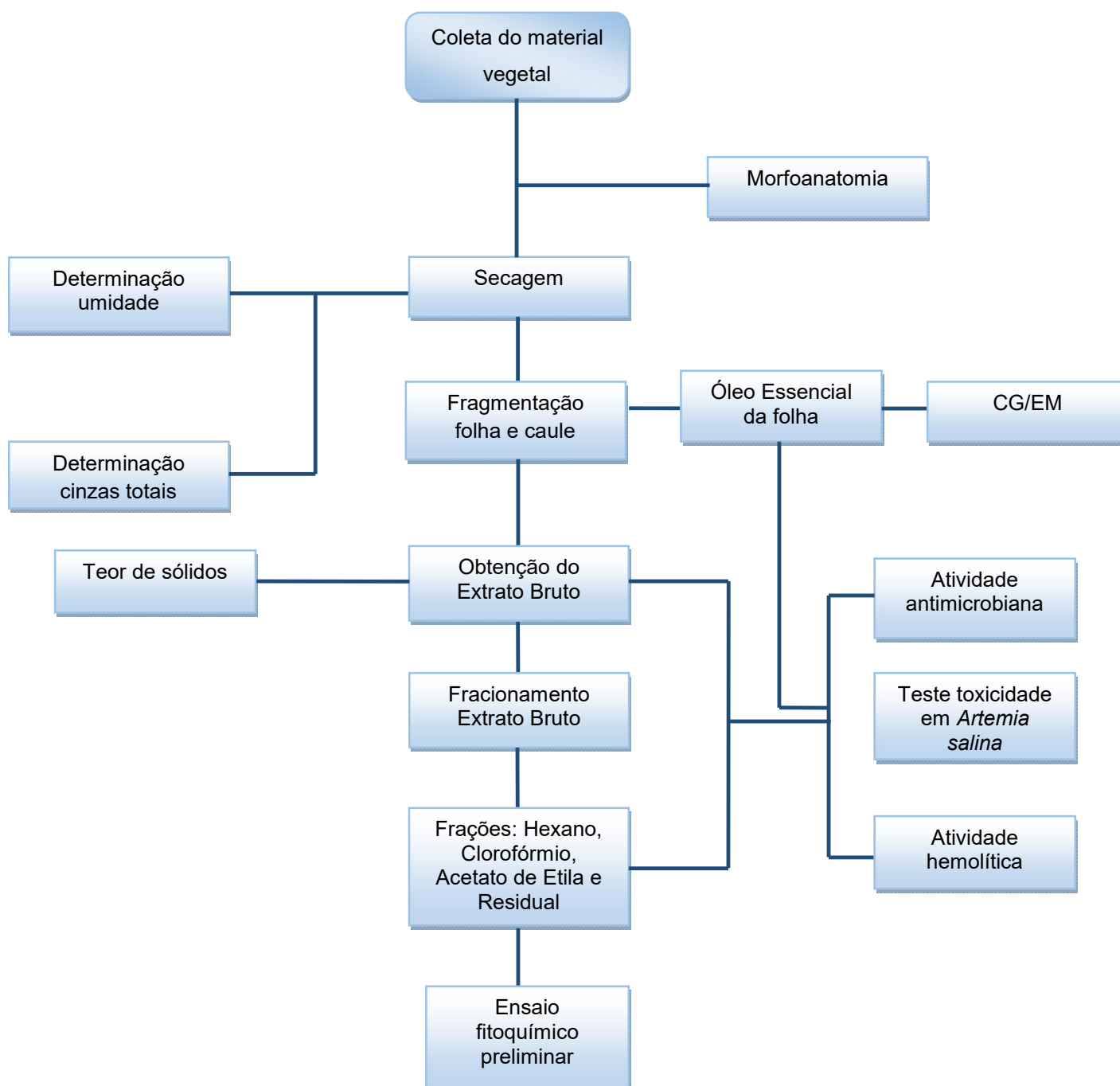
FONTE: O autor (2016).

Após a coleta, o material botânico foi separado em folhas e caule, gerando dois objetos de estudo. Para facilitar o preparo do material, foram utilizados ramos menos espessos. Foram obtidos 1200g de folha seca e 1000g de caule seco.

A utilização da espécie vegetal *Ocotea nutans* (Nees) Mez, possui autorização das atividades de acesso ao patrimônio genético expedido pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) através do projeto “Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais” constante no processo de nº **02001.001165/2013-47** (ANEXO 1).

Um fluxograma dos procedimentos práticos como determinação de umidade, cinzas totais e ensaio sistemático de análise fitoquímica e suas atividades biológicas estão resumidos na FIGURA 4.

FIGURA 4 - FLUXOGRAMA DE DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DE MATERIAL E MÉTODOS



FONTE: O Autor (2016)

3.2 ESTUDOS MORFOANATOMICOS

3.2.1 Preparo do material vegetal

Para a análise morfoanatômica foram retiradas as folhas adultas e os fragmentos de caule entre 5–25 cm do ápice e fixados em FAA, sendo este composto de formol, ácido acético glacial e álcool etílico a 70% (v/v), em proporção 0,5:0,5:9 (v/v). O tempo para fixar as amostras foi de 18 horas. A fixação em FAA foi realizada para bloquear imediatamente o metabolismo das células, preservando-as (JOHANSEN, 1940). Após a fixação do material em FAA, o caule e as folhas foram transferidos para álcool etílico a 70% (v/v) (BERLYN; MIKSCHE, 1976). Para a realização dos testes histoquímicos foram empregados folhas adultas e fragmentos de caule frescos ou fixados no FAA.

3.2.2 Preparo das lâminas

3.2.2.1 Lâminas semipermanentes

Cortes paradérmicos e transversais foram realizados à mão livre, tendo o auxílio de um suporte de isopor (QUINTAS, 1963). Os cortes obtidos foram corados com azul de astra e fucsina básica, respectivamente, para corar estruturas acidófilas e basófilas (ROESER, 1972). Para montagem das lâminas foi utilizado glicerina a 50%, visando preservar o material e fixar a lâmina com a lamínula (BEÇAK; PAULETTE, 1976; KRAUS; ARDUIN, 1997). Mesmo preservado em glicerina, o material pode sofrer modificações em contato com o ambiente, assim, foi necessário realizar a lutagem em esmalte incolor (BEÇAK; PAULETTE, 1976). Por fim, foi realizada a análise dos cortes e fotografados em aumentos de 4x, 10x, 20x e 40x no microscópio fotônico (BX40, Olympus®).

3.2.2.2 Lâminas permanentes

As lâminas permanentes foram confeccionadas a partir do material vegetal fixado em FAA. O material foi desidratado em série etanólica, colocando os cortes com álcool a 80% (v/v), após 2 horas a 95% (v/v) e em seguida, na pré-infiltração com álcool 95% (v/v) e parafina. Nessa fase de inclusão, a resina usada serve para facilitar a infiltração. O material foi infiltrado, por quatro dias, em glicol-metacrilato (Historesin, Leica®), emblocado e seccionado no micrótomo de rotação (CUT 4055, Olympus®), obtendo-se cortes extremamente finos. Ao final, os cortes foram corados com solução aquosa de azul de Toluidina a 5% e montados em resina sintética diluída em tolueno da marca Permount® (BEÇAK; PAULETE, 1976; KRAUS; ARDUIN, 1997). Esses cortes foram analisados e fotografados no microscópio fotônico nos aumentos de 4x, 10x, 20x e 40x (BX40, Olympus®).

3.2.2.3 Testes histoquímicos

Os testes histoquímicos foram realizados em caules e folhas que estavam fixados em FAA. Os testes foram realizados através da secção transversal à mão livre do material fixado, selecionando os melhores cortes e aplicando os reagentes utilizados para cada teste (QUADRO 4), posteriormente sendo lavados em água destilada e montados com glicerina 50%.

QUADRO 4 - TESTES HISTOQUÍMICOS EMPREGADOS NOS CORTES DO CAULE E DA FOLHA DE *Ocotea nutans*

GRUPO DE METABÓLITOS	REAGENTE	TEMPO DE REAÇÃO	RESULTADO POSITIVO
(I) Amido	Lugol (BERLYN; MIKSCH, 1976)	5 minutos	Azul negro ou marrom escuro
(II) Compostos fenólicos	FeCl ₃ (JOHANSEN, 1940)	10 minutos	Negro azulado ou verde escuro
(III) Compostos lipofílicos (lipídeos totais)	Sudam III (SASS, 1951)	10 - 20 minutos	Vermelho/ Róseo
(IV) Cristais de oxalato de cálcio	Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1991)	5 minutos	Azul escuro
(V) Lignina	Floroglucina (FOSTER, 1949)	5 minutos	Vermelho/ Róseo

FONTE: O autor (2016)

3.2.2.4 Microscopia eletrônica de varredura

A análise ultraestrutural de superfície em microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi empregada segundo Souza (2007). As amostras acondicionadas em FAA sofreram uma desidratação etanólica crescente (80%, 90% e 100%), sendo transferidas a cada 15 minutos.

Essas amostras foram inseridas em uma câmara preenchida com álcool absoluto e colocadas no aparelho de ponto crítico (CPD-030, Balt-Tec®). Nessa fase, ocorreu a remoção completa de álcool etílico por CO₂ para que o material ficasse completamente seco. O material, após ponto crítico, foi aderido com uma fita de cobre a um suporte do MEV e metalizado com ouro no aparelho SCD-030, Balzers®. Essa etapa tem como finalidade o aumento da condutividade da superfície da amostra devido à presença da fina camada de metal que através de bombeamento de íons pesados de argônio, os átomos de ouro se depositam sobre todas as reentrâncias e proeminências da superfície da amostra. A última etapa foi a observação e a análise no microscópio eletrônico de varredura (JSM 6360LV, JEOL®) que produz imagens tridimensionais.

3.4 ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

3.4.1 Determinação do teor de umidade

O procedimento foi executado em triplicata por meio do método gravimétrico, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). Utilizando material seco, triturado, foi pesado 1 g de amostra em cadinho de porcelana previamente seco, padronizado e identificado. O conjunto foi levado à estufa de circulação forçada de ar (100-105)°C, por cinco horas. Os cadinhos foram depositados em dessecador até resfriamento completo e procedeu-se à pesagem novamente.

O teor de umidade foi determinado a partir da diferença (em massa) entre a umidade do material estabilizado e a umidade do material seco em estufa, caracterizando a perda por umidade.

3.4.2 Determinação do teor de cinzas totais

Utilizando o mesmo material avaliado na determinação do teor de umidade em sequência foi realizada a determinação do teor de cinzas totais de acordo com a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). Os cadinhos recém-pesados (triplicata) na etapa final da Determinação do Teor de Umidade foram inseridos em mufla, com aumento de temperatura gradativo até (600±25)°C, para que todo o material fosse incinerado (aproximadamente 2 horas), tornando-se cinzas. Os cadinhos foram colocados em dessecador para então proceder-se à pesagem.

3.5 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES

3.5.1 Obtenção dos extratos brutos

Para obtenção dos extratos brutos foram utilizados 600g de material vegetal das folhas e 600g de material vegetal do caule. Os extratos brutos

cetônicos das folhas e caule secas foram obtidos em aparelho de Soxhlet ao longo de oito horas utilizando acetona como solvente. Os extratos foram filtrados e concentrados em evaporador rotativo com pressão reduzida à temperatura de 50°C e 90 rpm até a redução a 1/5 de seu volume inicial. Ao final das extrações, foram obtidos o extrato bruto da folha (EBF) e o extrato bruto do caule (EBC), ambos armazenados em frascos, a temperatura ambiente, até o momento do fracionamento.

3.5.2 Determinação do teor de sólidos totais

Utilizando placas de Petri de massa conhecida, foi determinado o teor de sólidos de alíquotas do extrato bruto do caule (EBC) e extrato bruto da folha (EBF), em triplicata. As alíquotas de 10 mL foram levadas à secura total em estufa a 60°C e o teor de sólidos totais (g/mL) foi determinado pela verificação da massa dos extratos secos nas placas de Petri, após resfriamento em dessecador, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010).

3.5.3 Obtenção das frações dos extratos brutos

O fracionamento dos extratos brutos em escala de polaridade é realizado para auxiliar na identificação das classes de metabólitos com atividades nos bioensaios. Além de facilitar a identificação, a possibilidade de isolamento destes metabólitos é muito maior desta forma, se comparada às tentativas baseadas apenas no extrato bruto.

Após reservada a alíquota de extratos brutos cetônicos necessária aos procedimentos de bioensaios, o restante dos extratos brutos das folhas (EBF) e do caule (EBC) foram fracionados por extração líquido - líquido, em aparelho de Soxhlet modificado, com os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila (em escala crescente de polaridade). O produto remanescente da última etapa de fracionamento foi denominado como fração cetônica ou residual. Por fim, foram obtidas oito frações (quatro de folhas e quatro do caule: hexânica (FHF e FHC),

clorofórmica (FCF e FCC), acetato de etila (AEF e AEC) e residual (FRF e FRC) correspondendo a quatro polaridades. Estas frações foram avaliadas nos bioensaios e demais testes juntamente com os próprios extratos brutos, totalizando dez amostras analisadas.

O Soxhlet modificado utiliza a auto-renovação do solvente e tem patente de modelo industrial no INPI sob o nº **0601703-7 A2** (MIGUEL et al., 2007).

3.6 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Para a realização do ensaio de CCD foram utilizadas cromatoplasas de sílica gel 60 UV₂₅₄, da marca Whatman®, de dimensões 20 x 20 cm, onde foram aplicados de 5 a 10 µL de cada amostra com microseringas. As análises de CCD foram realizadas conforme o QUADRO 5.

As placas foram visualizadas sob luz ultravioleta antes e após a revelação com seus respectivos reveladores. A análise foi realizada em triplicata.

QUADRO 5 - COMPOSIÇÃO DOS SOLVENTES DAS FASES MÓVEIS E REVELADORES DA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA REALIZADA PARA AS FRAÇÕES DE *Ocotea nutans*

CONSTITUINTE QUÍMICO	FASE MÓVEL/ PROPORÇÃO	REVELADOR	METODOLOGIA
ESTEROIDES TERPENOS	Tolueno: acetato de etila (93:7)	Vanilina 1%: ácido sulfúrico (1:1)	WAGNER, 1996
CUMARINA	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26)	Hidróxido de sódio	MIGUEL, 2003
FLAVONOIDES TANINOS	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26)	Reativo de NEU (flavonóide) Cloreto férrico 1% (tanino)	WAGNER, 1996
ALCALOIDES	Clorofórmio: metanol (95:5) universo amônio	Dragendorff	VALENTE et al., 2006

FONTE: O autor (2016).

3.7 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocotea nutans*

3.7.1 Extração do óleo essencial

Utilizou-se como método para a extração e obtenção do óleo essencial (OE) das folhas de *Ocotea nutans*, a hidrodestilação por arraste de vapor d'água, realizado em aparato de Clevenger modificado (BRASIL, 2010). As folhas secas a temperatura ambiente (600g) foram trituradas e acondicionadas em balão de fundo redondo de 3000 mL, adicionando-se quantidade suficiente de água destilada (5 a 10 vezes o seu peso) para cobrir o material e permitir a extração. O balão foi conectado ao equipamento e submetido a uma temperatura em torno de 100°C, com tempo de extração de 6 horas. Decorrido este tempo, anotou-se o volume de óleo obtido pela leitura no tubo com escala de graduação. O óleo obtido foi armazenado em freezer a fim de evitar sua volatilização.

3.7.2 Rendimento do óleo essencial

O rendimento foi calculado em mililitros de óleo essencial por 100 g do vegetal (mL%), conforme preconiza a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010).

3.7.3 Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM)

Uma alíquota do óleo essencial, após a extração, foi armazenada em frasco apropriado, devidamente refrigerado e reservado para análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massa (CG/EM). Executou-se a análise cromatográfica em aparelho Shimadzu® modelo GCMS-QP 2010 Plus equipado com coluna capilar Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Injetor em modo *splitless* a 250°C, interface e fonte de íons a 300 °C. A janela de massas analisada foi entre m/z 40 e m/z 350, utilizando o gás Helio como gás de arraste. Rampa de injeção para análise com temperatura do injetor em 250°C, pressão da coluna de 20 psi, iniciando-se com temperatura de 50°C por 5 minutos elevando-

se para 200°C a uma razão de 5°C/min, disponibilizada e realizada pelo Departamento de Química (UFPR).

3.8 PERFIL DAS AMOSTRAS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DIODO (CLAE/DAD)

Os extratos brutos e frações das folhas e do caule de *Ocotea nutans* foram diluídos em metanol (MeOH) a uma concentração de 20 mg/mL e submetidos à análise por CLAE (Merck Hitachi – Elite Lachrom) com detector diodo (DAD) em 300 nm, coluna (XTerra®) preparativa de fase reversa RP₁₈ (5 µm, 4,6x250 mm), com volume de injeção de 20 µL, fluxo 1,00 mL/min. Como fase móvel foi utilizado o gradiente de concentração o sistema H₂O:H₃PO₄ a 0,1% (A) e MeOH (B) na seguinte programação: 1-45 min, iniciando com 10% de fase B e finalizando em 45 min com 100% de fase B. O metanol utilizado foi grau HPLC (TEDIA) e a água MilliQ.

3.9 ESTUDOS DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

3.9.1 Ensaios de toxicidade *in vitro*

Os testes de toxicidade *in vitro* são técnicas utilizadas com intuito de diminuir ou substituir métodos que utilizam animais na experimentação, para determinações prévias de toxicidade do material vegetal. Os métodos para avaliação de toxicidade dos extratos brutos e frações do caule e da folha e também do óleo essencial da espécie *Ocotea nutans* foram toxicidade aguda sobre o microcrustáceo *Artemia salina* e atividade hemolítica *in vitro*.

3.9.1.1 Atividade tóxica em *Artemia salina*

Os ensaios de *Artemia salina* foram realizados com extratos brutos, frações e óleo essencial nas concentrações de 1000, 500, 100 e 10 µL/mL. Os extratos e frações da folha e do caule foram diluídos com 1% de dimetilsulfóxido

(DMSO) e o óleo essencial com 0,5% de Polissorbato 80 e o volume completado com água do mar artificial até a concentração desejada.

Para avaliação dos extratos brutos, frações e óleo essencial de *Ocotea nutans* foi utilizado o método descrito por Meyer et al. (1982) que determina a CL_{50} em $\mu\text{g/mL}$ de compostos ativos e extratos nos meios. Foi utilizada água do mar artificial, preparada com 30 gramas de sal marinho e 1.000 mL de água destilada. O pH foi ajustado com Na_2CO_3 para a faixa de 8-9, para evitar a morte das larvas que são sensíveis ao pH abaixo de 6 ou acima de 10,5 (LEWAN et al., 1992). Os ovos de *Artemia salina* (200mg/400mL) foram colocados em contato com a água do mar artificial e aerados por uma hora e então incubados em temperatura (27-30)°C por 48 horas, com iluminação constante. Para efeitos de controle, os náuplios foram avaliados frente aos solventes utilizados (DMSO 1% e Polissorbato 0,5%, ambos em salina). Como controle negativo (branco) foi utilizado solução salina e como controle positivo Dodecil sulfato de sódio (SDS) nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{g/mL}$ (VEIGA; VITAL, 2002). Foram colocadas em cada tubo contendo a amostra e controles, 10 náuplios de *Artemia salina*, os quais foram novamente incubados em temperatura de (27-30)°C por 24 horas. Em seguida, foi realizada a contagem de náuplios imóveis. Os dados obtidos foram analisados pelo método estatístico Probitos (FINNEY, 1956) para a determinação dos valores de CL_{50} e 95% de intervalos de confiança. Todos os testes foram realizados em triplicata, sendo consideradas amostras ativas aquelas em que a CL_{50} for menor que 1000 ppm (1000 $\mu\text{g/mL}$), de acordo com Meyer (1982).

3.9.1.2 Atividade hemolítica *in vitro*

Este método foi realizado seguindo protocolo estabelecido por Banerjee et al. (2008), com modificações. O sangue de carneiro utilizado foi adquirido da empresa Newprov®. No momento dos ensaios, o sangue de carneiro foi levemente homogeneizado e 5 mL foram transferidos a um tubo de ensaio para centrifugação durante 5 minutos a 3000rpm. Após a centrifugação o sobrenadante

foi desprezado, e o precipitado lavado com tampão fosfato-salino (PBS) gelado. O processo se repetiu até que o sobrenadante ficasse completamente incolor. Em seguida a papa de eritrócitos foi diluída com PBS para obtenção de uma diluição a 2%. Para a realização da prova de hemólise foram utilizados extratos brutos, frações e o óleo essencial nas concentrações de 1000, 500, 200 e 100 µg/mL. A diluição das amostras foi feita com 10% de metanol e PBS.

Como controle negativo foi utilizado 200 µL de PBS em 200 µL de solução de eritrócito a 2%. Como controle positivo foi utilizado 200 µL de água destilada em 200 µL de solução de eritrócito a 2%. No controle solvente foram adicionados 20 µL de metanol mais 180 µL de PBS em 200 µL de solução de eritrócito a 2%.

Esta análise foi realizada em *ependorfs* onde foram colocados 200 µL das amostras ou controles, e 200 µL de solução de eritrócitos a 2%. Os tubos de *ependorfs* foram homogeneizados manualmente sobre leve agitação e incubados durante 3 horas em estufa a temperatura de 37°C. Após, foram levados a centrifugação, em centrífuga Minispin Plus da empresa Eppendorf®, a 3000rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para placa de Elisa de 96 poços, para posterior leitura em espectrofotômetro na faixa de 540nm. Para comparação entre as médias dos índices de atividade (IA%), utilizou-se o teste de Duncan (DUNCAN, 1955). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3.9.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

3.9.2.1 Micro-organismos

As cepas utilizadas para a atividade antimicrobiana foram: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

3.9.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima pela técnica de microdiluição

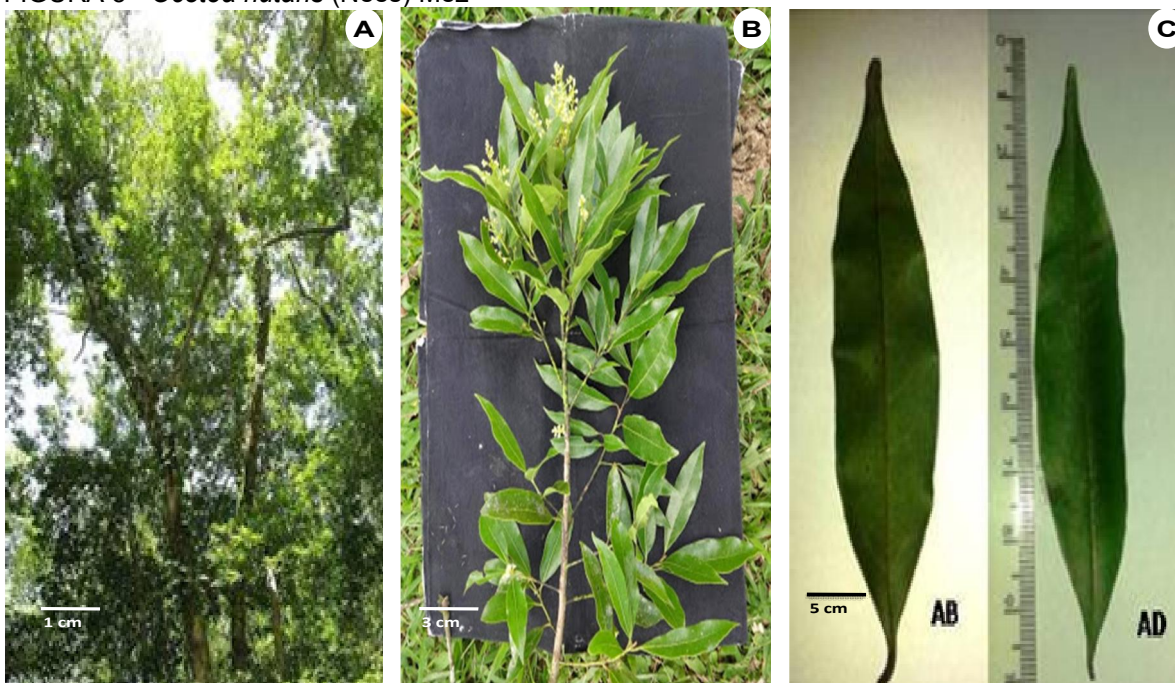
Para a determinação dos valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2008). A diluição dos extratos brutos e frações foi realizada com 2% de dimetilsulfóxido (DMSO) completadas com etanol 10% e o óleo essencial foi diluído com 5% de polissorbato 80. Os extratos brutos, frações e óleo essencial foram preparados através de diluição seriada em 100 µL de caldo Muller Hinton Broth (MHB – Merck, Darmstadt, Alemanha), em concentrações que variaram de 7,81 a 1000 µg/mL, em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em “U”. As suspensões bacterianas foram preparadas em solução fisiológica na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, equivalente ao tubo 0,5 de *McFarland*, e incubadas em um volume de 5µL nos orifícios apresentando uma concentração final de 10^4 UFC/mL. O controle negativo da atividade inibitória dos diluentes dos extratos, frações (etanol e DMSO) e óleo essencial (polissorbato 80) foi realizado adicionando-se 100 µL de solução do diluente em 100 µL de MHB e 5 µL dos inóculos bacterianos. O controle de esterilidade foi realizado utilizando 100 µL de MHB e 100 µL dos extratos brutos, frações e do óleo essencial. Para verificar a viabilidade bacteriana foi utilizado 100 µL de MHB e 5 µL dos inóculos bacterianos. A incubação das microplacas foi realizada em estufa bacteriológica em temperatura constante de 35°C por 16 a 20 horas. Após, foi adicionada solução aquosa do revelador cloreto de 2,3,5- trifeniltetrazólio (TTC – Merck, Darmstadt, Alemanha) a 0,5% (20 µL) e as microplacas foram incubadas novamente por três horas a 35°C. Em seguida foi realizada a interpretação dos resultados, onde a coloração vermelha/rósea foi interpretada como ausência de atividade antimicrobiana e a ausência de coloração vermelha/rósea foi considerada como presença de atividade antimicrobiana. A vancomicina foi o antimicrobiano de escolha para a validação da técnica e controle metodológico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTUDO MORFOANATÔMICO

Morfológicamente, as folhas de *Ocotea nutans* (FIGURA 5C) medem 7,8 cm de comprimento e 1,9 cm de largura, são lanceoladas, com ápice agudo, base cuneada em pecíolo, este medindo 0,4 cm de comprimento, glabro e canaliculado. Face abaxial e adaxial glabra, de reticulação densa, nervura primária saliente e com ausência de domácias. A descrição da folha ocorreu de acordo com o material vegetal utilizado, e os relatos condizem com a descrição feita por Brotto e colaboradores (2013).

FIGURA 5 - *Ocotea nutans* (Nees) Mez



FONTE: O autor (2016)

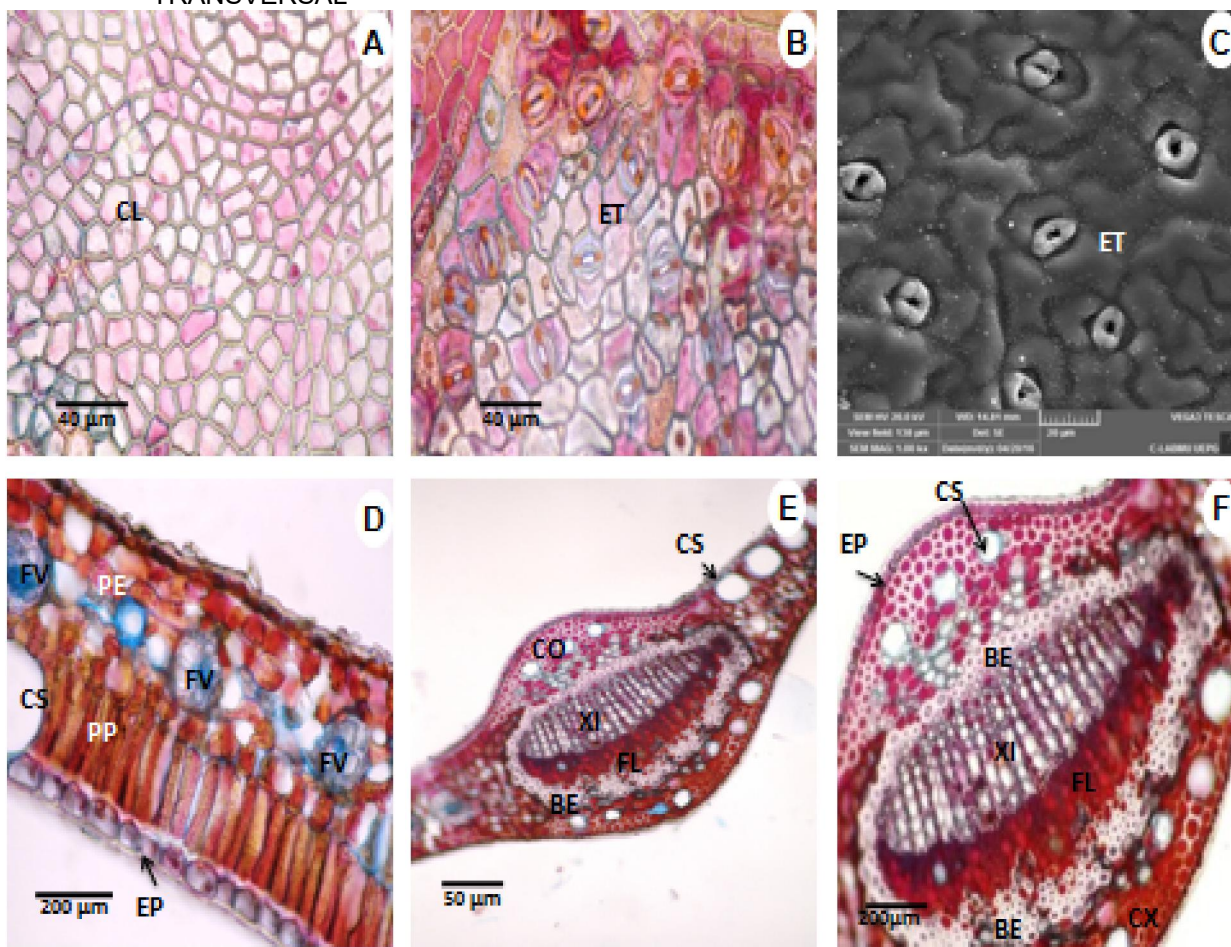
NOTA: **A:** Planta no hábito; **B:** Ramo das folhas; **C:** folhas em face abaxial (AB), face adaxial (AD)

A epiderme da lâmina foliar, em vista frontal, na face adaxial, apresenta células epidérmicas de formas poliédricas de tamanho irregular com paredes anticlinais de formato reto (FIGURA 6A) e com células epidérmicas levemente onduladas na face abaxial (FIGURA 6B). A folha é caracterizada como hipoestomática, com estômatos do tipo paracítico presentes apenas na face abaxial e localizados no mesmo nível das demais células epidérmicas (FIGURA 6C). Esse tipo de estômato é característico em Lauraceae (METCALFE; CHALK, 1972), sendo observados nas espécies *Ocotea gardneri* (Meisn.) Mez (COUTINHO et al. 2006b), *Ocotea puberula* (Rich.) Nees (FARAGO et al., 2005) e *Ocotea duckei* Vattimo (COUTINHO et al., 2006a)

Em secção transversal, a epiderme de *Ocotea nutans* mostra-se unisseriada com células isodiamétricas em ambas as faces. A cutícula é relativamente espessa, sendo lisa em ambas as faces e mais espessa na face adaxial (FIGURA 6E) e reagiu positivamente ao teste com Sudam III (FIGURA 10A).

Diferente da espécie *Ocotea puberula* (FARAGO et al., 2005) a espécie *Ocotea nutans* não possui tricomas glandulares e nem tectores. A presença de tricomas simples, unicelulares e pluricelulares, é comum em Lauraceae (FAHN, 1990). Sua ausência também foi observada em *Ocotea gardneri* (COUTINHO et al., 2006b). No estudo de Coutinho et al. (2006a), os autores não evidenciaram nas fotomicrografias a presença ou ausência de tricomas em *Ocotea duckei*, portanto para a espécie a comparação não é feita com exatidão, só com a observação visual das fotomicrografias, na qual possivelmente se assemelha com *Ocotea nutans* e *Ocotea duckei* com ausência de tricomas.

FIGURA 6 - *Ocotea nutans* (Ness) Mez – FOLHA EM CORTE PARADÉRMICO E SECÇÃO TRANSVERSAL



FONTE: O autor (2016).

NOTA (1) **A:** Epiderme vista frontal, face adaxial, corte paradérmico; **B:** corte paradérmico, face abaxial, presença de estômatos; **C:** Presença de estômatos em MEV. **D:** Aspecto geral da expansão da lamina foliar; **E:** Nervura central evidenciando o cilindro vascular medular e o feixe vascular interno; **F:** Sistema vascular.

(2) Cutícula lisa (CL); Estômato (ET); Colênquima (CO); Córtex (CX); Epiderme (EP); Parênquima paliádico (PP); Parênquima esponjoso (PE); Bainha esclerenquimática (BE); Floema (FL); Feixe vascular (FV); Xilema (XI); Célula secretora (CS); Microscopia eletrônica de varredura (MEV).

O mesofilo é do tipo dorsiventral (FIGURA 6D), composto por parênquima clorofiliano paliádico uniestratificado e parênquima clorofiliano esponjoso variando de quatro a oito estratos. Distribuídos no mesofilo, também são observadas células secretoras de substâncias de natureza lipofílica e mucilagínosa (FIGURA 6D, 6E). As espécies *Ocotea puberula* (FARAGO et al., 2005) e *Ocotea duckei* (COUTINHO et al., 2006a) possuem a mesma descrição para o mesofilo e as demais estruturas celulares, sendo as mesmas descrições relatadas por Metcalfe e Chalk (1972) onde o mesofilo dorsiventral é considerado padrão para as Lauraceae. Já *Ocotea gardneri* (COUTINHO et al., 2006b) difere-se ao proposto encontrado para a família Lauraceae apresentando mesofilo do tipo isobilateral, não usual a família, cujo caractere segundo Coutinho et al., (2006b) pode auxiliar na identificação desta espécie.

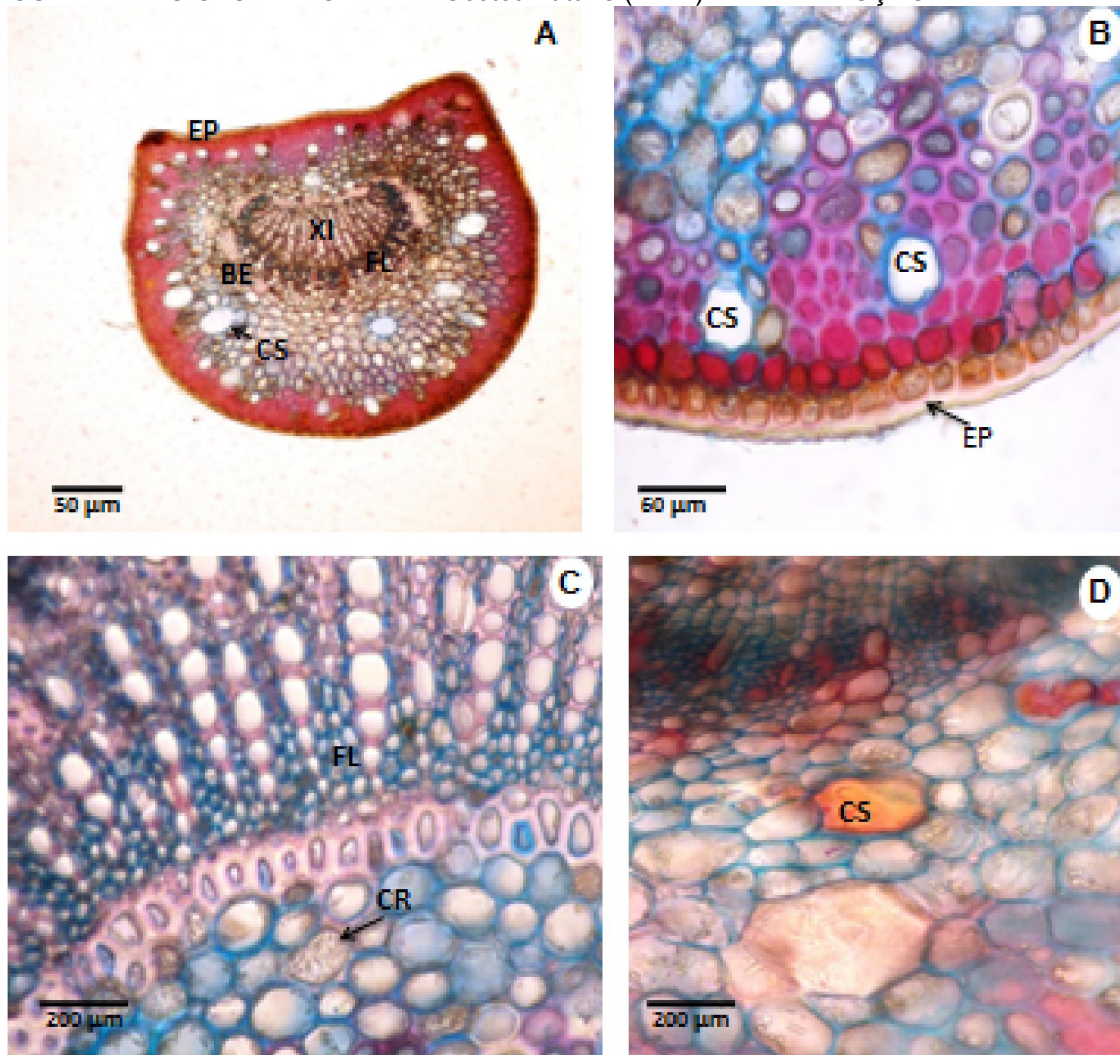
A nervura central (FIGURA 6E) apresenta-se biconvexa, descrição também semelhantes as espécies *Ocotea gardneri* (COUTINHO et al., 2006b), *Ocotea puberula* (FARAGO et al., 2005) e *Ocotea duckei* (COUTINHO et al., 2006a). A epiderme é uniestratificada, com células que apresentam a parede periclinal externa de formato levemente lenticular em ambas as faces sendo revestida por cutícula relativamente espessa. Subjacente à epiderme observam-se camadas de colênquima angular, com seis estratos junto à face adaxial e aproximadamente quatro estratos na face abaxial.

O sistema vascular (FIGURA 6F) possui o xilema voltado para a face adaxial e é constituído por um feixe único do tipo colateral em arco aberto. O xilema apresenta elementos traqueais enfileirados que são separados por raios parenquimáticos. Entre o xilema e o floema verifica-se o câmbio vascular e todo o feixe vascular é envolto por uma bainha esclerenquimática. Na região central, há um único feixe vascular do tipo colateral, envolvido por uma densa bainha de fibras esclerenquimáticas, as quais reagiram positivamente com floroglucina clorídrica nos testes histoquímicos. As fibras esclerenquimáticas podem estar isoladas ou agrupadas, sendo predominantes na face adaxial.

Em secção transversal, o contorno do pecíolo (FIGURA 7A) tem formato côncavo na face adaxial e convexo na face abaxial. A descrição do pecíolo é

diferente das outras espécies comparadas, como por exemplo, *Ocotea gardneri* (COUTINHO et al. 2006b) em que o pecíolo em secção transversal é plano-convexo na região distal e biconvexo na região mediana e proximal. A espécie *Ocotea puberula* (FARAGO et al., 2005) tem o pecíolo em formato plano-convexo e *Ocotea duckei* (COUTINHO et al., 2006a) apresenta o pecíolo plano-convexo em porção basal e mediano e biconvexo com proeminências lateral na porção apical.

A epiderme é uniestratificada, revestida por cutícula espessa (FIGURA 7B) com ausência de tricomas. Das espécies comparadas nessa discussão a única que apresentou tricoma no pecíolo foi a espécie *Ocotea gardneri* (COUTINHO et al., 2006b). Adjacente à epiderme, encontram-se várias camadas de colênquima angular, sendo o parênquima fundamental formado por células irregulares, com presença de esclereides e cristais de oxalato de cálcio em concordância com o descrito por Santos e Oliveira (1995) (FIGURA 7C). Uma bainha esclerenquimática em diferentes estágios de lignificação envolve o feixe vascular. Assim como na folha, o pecíolo também apresenta células secretoras oleíferas com conteúdo lipofílico e mucilaginoso (FIGURA 7D).

FIGURA 7 - PECÍOLO DA FOLHA DE *Ocotea nutans* (Nees) Mez EM SECÇÃO TRANSVERSAL

FONTE: O autor (2016)

NOTA: (1) **A**: Visão geral da secção transversal do pecíolo; **B**: Córtex aproximado evidenciando a epiderme e células secretoras **C**: Região perimedular com presença de cristais de oxalato de cálcio; **D**: célula secretora evidenciada com óleo essencial.

(2) Epiderme (EP); Bainha esclerenquimática (BE); Xilema (XI); Floema (FL); Célula secretora (CS); cristais de oxalato de cálcio (CR);

O caule é o órgão que possui como principal função a sustentação de todo o vegetal, incluindo as partes vegetativas e as reprodutivas e, ainda mantém contato entre esses órgãos e as raízes. É formado pela epiderme e/ou periderme e constituído por regiões cortical, vascular e medular. A epiderme, geralmente, é unisseriada e coberta por cutícula. O córtex é, na maioria das vezes, composto de células parenquimáticas e homogêneas. O sistema vascular é composto por

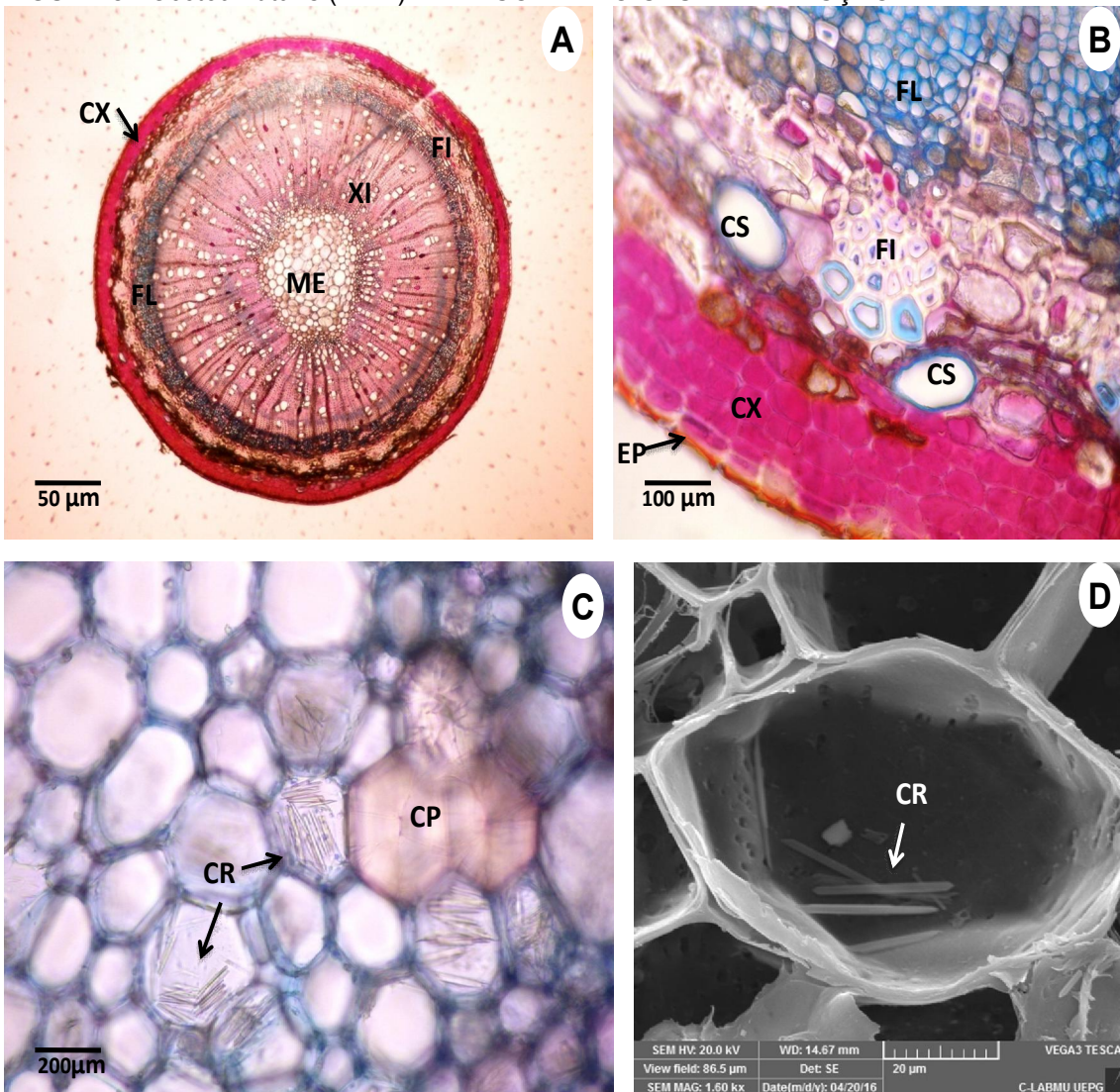
floema, câmbio e xilema (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1991; APPEZZATO-DA-GLORIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006).

O caule de *Ocotea nutans*, seccionado transversalmente, apresenta formato circular. A epiderme é uniestratificada com células isodiamétricas (FIGURA 8A) revestida por espessa cutícula evidenciada por Sudam III. Não foi observada a presença de tricomas tectores ou glandulares.

No córtex, subjacente à epiderme, é observado a presença de células que reagem positivamente com cloreto férrico e dicromato de potássio e estruturas secretoras são observadas (FIGURA 9D). As células oleíferas apresentam-se normalmente esféricas, com as paredes suberizadas e com conteúdo amarelado (FIGURA 7D). As células mucilaginosas são semelhantes em tamanho, forma e distribuição as oleíferas, sendo encontradas em, pelo menos, quatorze gêneros. Segundo Metcalfe (1987) é comum a presença de células secretoras de óleos ou de mucilagem em aproximadamente vinte gêneros da família Lauraceae.

A região medular apresenta células grandes com paredes delgadas, no entanto com pequeno volume medular. Células pétreas ou braquiesclereides (FIGURA 9A, 9B) são observadas, essa característica vai ao encontro com o descrito para outras espécies do gênero (SANTOS; OLIVEIRA, 1995). Cristais de oxalato de cálcio do tipo ráfide e estilóide são encontrados na região perimedular (FIGURA 8C). De acordo com Nakata (2003) essas substâncias apresentam importantes funções no vegetal, tais como proteção contra herbivoria, regulador de cálcio podendo atuar como agente desintoxicante devido ao fato do cristal poder incorporar um metal pesado.

O tipo de cristal e a sua localização apresentam uma importante característica de diferenciação para os estudos farmacobotânicos (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1991).

FIGURA 8 - *Ocotea nutans* (Ness) Mez – CORTE DO CAULE EM SECÇÃO TRANSVERSAL

FONTE: O autor (2016).

NOTA (1): **A:** Caule em secção transversal, evidenciando córtex, floema, xilema, medula; **B:** Detalhe do sistema vascular do caule. **C:** Região perimedular evidenciando cristais de oxalato de cálcio e células pétreas; **D:** Cristais por microscopia eletrônica de varredura.

(2): Córtex (CX); Cristais de oxalato de cálcio (CR); Células pétreas (CP); Células secretoras (CS); Fibras (FI); Floema (FL); Xilema (XI), Medula (ME).

Os testes histoquímicos permitem a identificação estrutural de compostos químicos presentes em vegetais que podem ser quantificados em função da intensidade de luz observada através da microscopia. A técnica é baseada na reação da estrutura celular do tecido vegetal com o reagente químico utilizado para corar a estrutura procurada.

Os resultados dos testes histoquímicos para folhas e caule estão descritos na TABELA 1.

TABELA 1 - TESTES HISTOQUÍMICOS REALIZADOS EM FOLHAS E CAULE DE *Ocotea nutans*

COMPOSTOS	FOLHA	CAULE
AMIDO	-	-
COMPOSTOS FENÓLICOS	+	+
COMPOSTOS LIPOFÍLICOS	+	+
CRISTAIS DE OXALATO DE CÁLCIO	-	+
LIGNINA	+	+

FONTE: O autor (2016)

LEGENDA: reação positiva (+); reação negativa (-)

Os métodos histoquímicos estão fundamentados nas reações cromáticas para o reconhecimento de substâncias de membranas e conteúdo celular. São análises mais qualitativas do que quantitativas dos componentes celulares. A histoquímica vegetal distingue dois grupos de compostos lipofílicos (polares), lipídios totais, insaturados, ácidos graxos, terpenóides (óleos, resinas e lactonas sesquiterpênicas) e compostos hidrofílicos (apolares), sendo estes fenólicos, amidos, taninos, alcalóides, entre outros (PEARSE, 1960; GERSBACH; REDDY 2002; DORES, 2007).

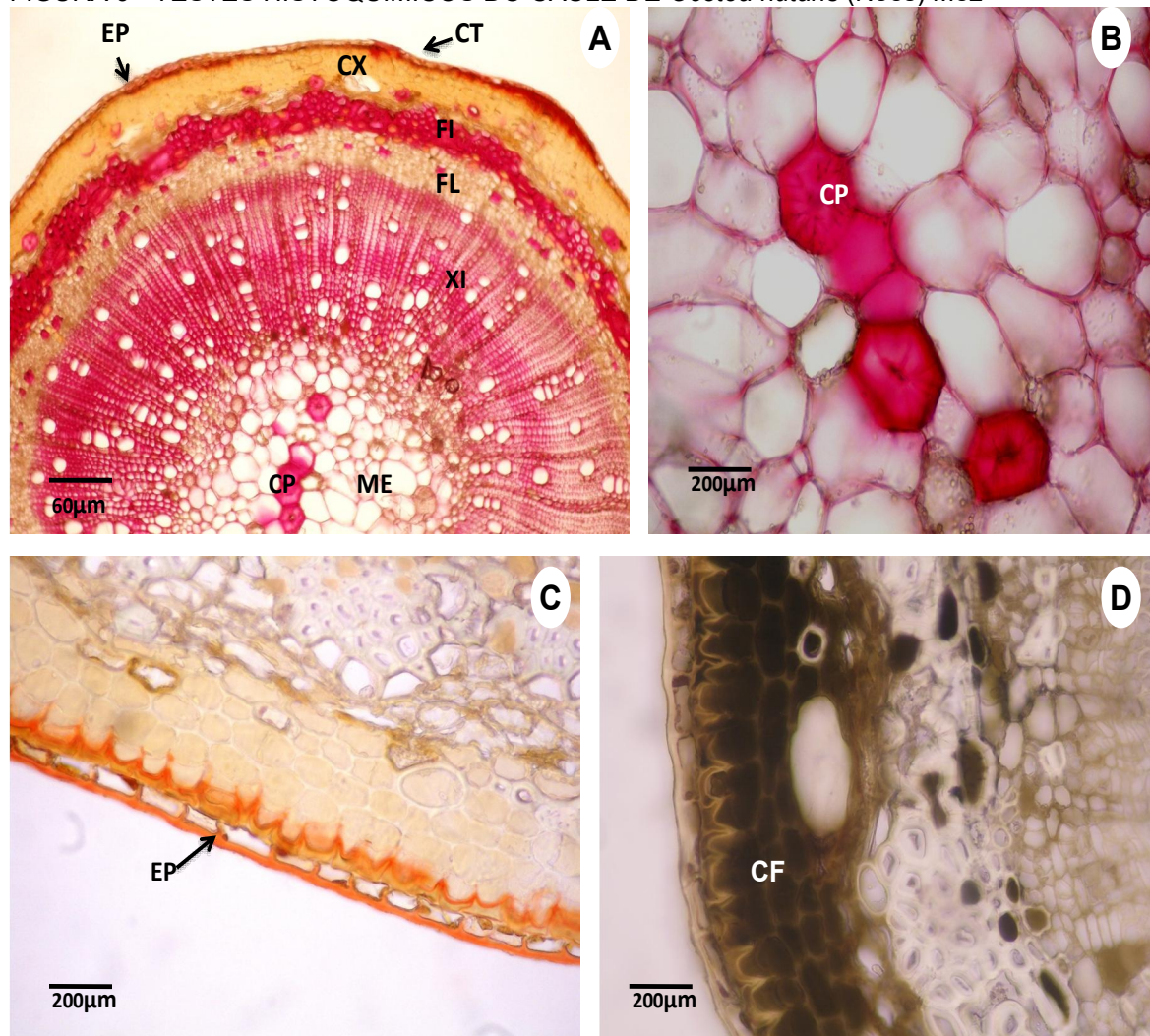
O teste de sudan III evidencia compostos lipofílicos, e foi positivo para a folha (FIGURA 10A) e para o caule (FIGURA 9C). Observou-se concentração de lipídios na superfície foliar em regiões mais próximas à epiderme.

O teste com lugol foi negativo para folhas e caule. As secções transversais de folhas não apresentaram a presença de amido em suas estruturas.

A reação com cloreto férrico oxida compostos fenólicos pela influência do metal da solução, ocasionando o escurecimento do tecido. Os compostos fenólicos foram evidenciados nas folhas (FIGURA 10E) e no caule (FIGURA 9D).

O teste para presença de lignina foi positivo para a folha (FIGURA 10D) e para o caule (FIGURA 9A).

FIGURA 9 - TESTES HISTOQUÍMICOS DO CAULE DE *Ocotea nutans* (Nees) Mez



FONTE: O autor (2016).

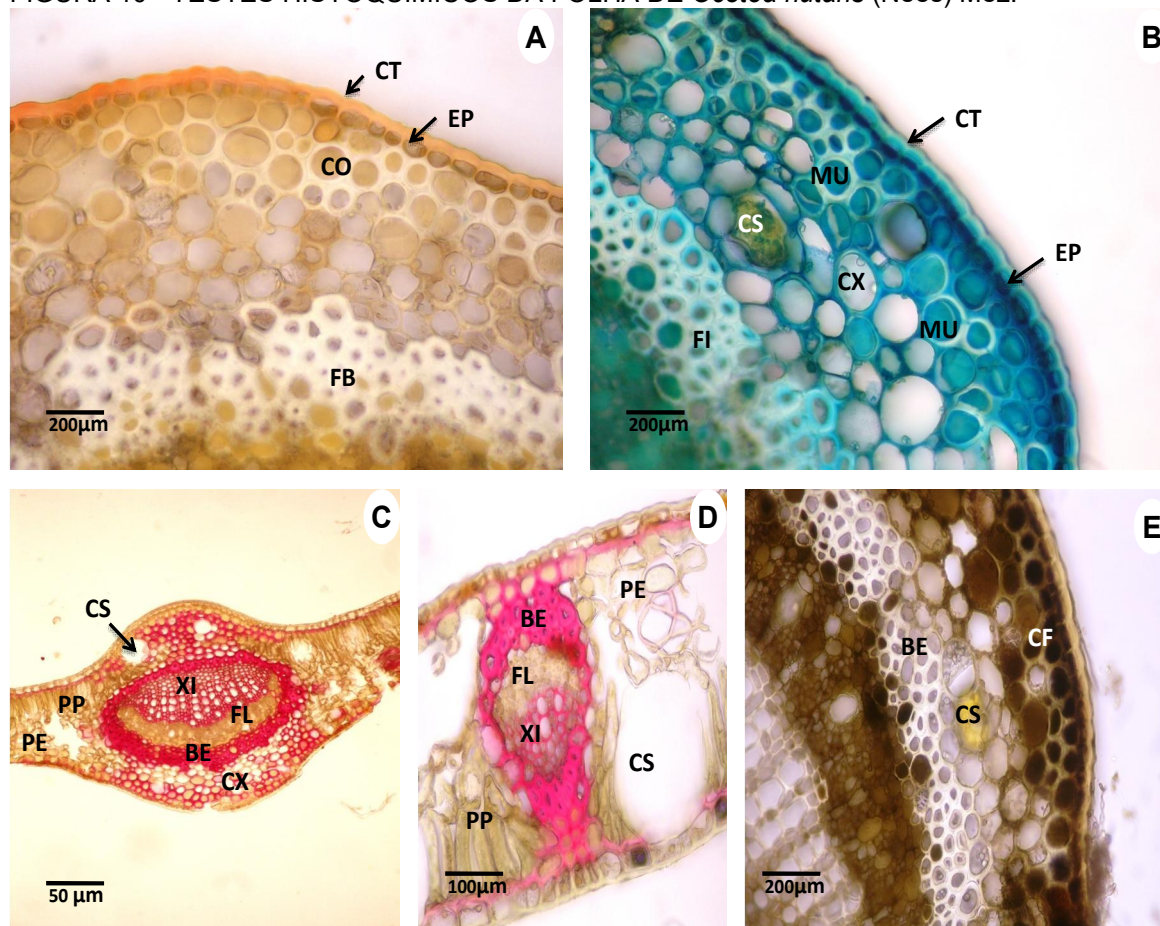
NOTA (1): **A** – Teste com floroglucina. **B** - Células pétreas (na medula do caule). **C** - Teste com Sudam III, evidenciando cutícula. **D** Reação com cloreto férrico (compostos fenólicos).

(2): Epiderme (EP); Compostos fenólicos (CF), células pétreas (CP); Medula (ME);

Xilema (XI); Floema (FL); Fibras (FI); Córtex (CX); Cutícula (CT).

O teste com azul de metileno, corante que evidencia mucilagens, foi positivo para as folhas (FIGURA 10B). Pode-se observar, em amarelo, a presença de célula secretora de óleo essencial.

FIGURA 10 - TESTES HISTOQUÍMICOS DA FOLHA DE *Ocotea nutans* (Nees) Mez.



FONTE: O autor (2016)

NOTA (1): **A.** Cutícula evidenciada com Sudam III. **B** azul de metileno (característico para mucilagem); **C e D** – Floroglucina corando lignina (rosa). **D** feixe vascular de pequeno porte, envolvido por bainha esclerenquimática **E.** Reação com cloreto férrico, as células escuras (marrom intenso, quase preto) apresentam compostos fenólicos (cf).

(2): Célula secretora (CS); Compostos fenólicos (CF); Córtex (CX); Cutícula (CT); Colênquima (CO); Epiderme (EP); Fibras (FI); Mucilagem (MU); Floema (FL); Bainha esclerenquimática (BE); Praquenquima paliçádico (PP); Parenquima eponjoso (PE); Xilema (XI)

A descrição da morfologia vegetal é importante tanto para a caracterização e identificação da planta como para o conhecimento da flora de uma região, podendo encontrar caracteres específicos da espécie, designados como marcadores. Esses marcadores podem estar relacionados à forma ou a uma dada característica, onde se houver dificuldade de distinção entre elas pode servir para discriminar as espécies (SONAGLIO et al., 2004).

4.2 ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Os ensaios físico-químicos são importantes parâmetros a se estabelecer, pois definem e confirmam padrões de controle de qualidade para determinada espécie, uma vez que denunciam adulterações ou falsificações de materiais. No caso de *Ocotea nutans*, foram estabelecidos pela primeira vez, agregando dados inéditos ao compilado da espécie.

Os parâmetros de análise do teor de umidade e cinzas totais foram determinados pela primeira vez para a espécie *Ocotea nutans*. Esta análise tem grande importância uma vez que pode auxiliar na identificação botânica e identificação de impurezas na amostra (BRASIL, 2010). A combinação destes parâmetros físico-químicos é exclusiva de cada espécie. O teor de umidade e cinzas mostra variações conforme a parte morfológica analisada. Foi encontrado um valor maior de umidade no caule e de cinzas na folha. Os resultados estão demonstrados como média \pm desvio padrão na TABELA 2.

TABELA 2 - ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO MATERIAL VEGETAL

ANÁLISE	UMIDADE (%)	CINZAS (%)
FOLHA	8,45 \pm 0,029	4,80 \pm 0,012
CAULE	11,31 \pm 0,004	9,13 \pm 0,033

FONTE: O autor (2016)

O teor máximo de umidade estabelecido nas diferentes farmacopeias varia entre 8 e 14%, com poucas exceções especificadas em monografias (BRASIL, 2010). A presença de umidade em material prima vegetal propicia a ação de enzimas podendo acarretar a degradação de constituintes químicos, além de possibilitar o desenvolvimento de fungos (FARIAS, 2003).

A determinação do teor de cinzas permite a verificação de impurezas inorgânicas não voláteis que podem estar presentes como contaminantes no material vegetal (FARIAS, 2003). É representado pela soma de material inorgânico integrante da espécie (cinzas intrínsecas) com as substâncias aderentes de origem terrosa (cinzas extrínsecas) (BRAGA et al., 2007). Na Farmacopeia Brasileira não há informações sobre o limite máximo de cinzas para espécies vegetais, porém o resultado da determinação de cinzas totais apresenta-se abaixo de 14%, conforme os limites estabelecidos nas monografias de diversas drogas vegetais descritas.

4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS DOS EXTRATOS DAS FOLHAS E CAULE DE *Ocotea nutans*

Assim como os ensaios físico-químicos, o teor de sólidos de extratos das folhas e caules pode ser aplicado como parâmetro de controle de qualidade dos extratos. Não há padrões estabelecidos para valores aceitáveis de teor de sólidos de extratos, pois a descrição do teor é inédita a essa espécie. Conforme metodologia descrita, os teores de sólidos totais (g/mL) dos extratos brutos das folhas e do caule estão descritos na TABELA 3 (média \pm desvio padrão).

TABELA 3 - TEOR DE SÓLIDOS DO EXTRATO BRUTO DE *Ocotea nutans*

AMOSTRA	TEOR DE SÓLIDOS (g/mL)
FOLHAS	0,1282 \pm 0,0009
CAULE	0,1866 \pm 0,0023

FONTE: O autor (2016)

4.4 RENDIMENTO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Ocotea nutans*

O rendimento dos extratos brutos foi calculado a partir do valor obtido de sólidos totais. O caule possui um rendimento de $(18,66 \pm 0,2)\%$ e nas folhas o rendimento foi de $(12,82 \pm 0,09)\%$. Após o cálculo do rendimento, o EBF e EBC foram fracionados para a obtenção da fração hexano (FH), fração clorofórmio (FC), fração acetato de etila (FAE) e fração remanescente (FR). Na TABELA 4 foi demonstrado o rendimento de cada fração em relação ao extrato bruto.

TABELA 4 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS POR SOXHLET

AMOSTRA	MASSA OBTIDA (g)		RENDIMENTO (%) EM RELAÇÃO AO EXTRATO BRUTO TOTAL	
	FOLHA	CAULE	FOLHA	CAULE
FH	8,8211	12,3988	42,98%	41,52%
FC	6,0878	5,8394	29,66%	19,55%
FAC	1,3973	7,2629	6,08%	24,32%
FR	4,2138	4,3589	20,53%	14,59%

FONTE: O autor (2016)

NOTA: Fração hexânica (FH), Fração clorofórmio (FC), Fração Acetato de etila (FAE) e Fração residual (FR).

Pode-se observar que a fração com maior rendimento foi a fração hexano da folha (FHF) seguido da fração hexano do caule (FHC), e a de menor rendimento foi a fração acetato de etila da folha (FACF) seguido da fração clorofórmio do caule (FCC).

4.5 ANÁLISE DE COMPOSTOS POR CCD

A análise fitoquímica preliminar é realizada para obter informações qualitativas acerca dos principais grupos de metabólitos presentes na amostra.

A cromatografia em camada delgada (CCD) é um método considerado rápido, eficiente de baixo custo e fácil reprodutibilidade. Esta análise tem como objetivo avaliar as características qualitativas dos principais grupos químicos presentes nas frações, utilizando reações de coloração e fluorescência.

Por meio da análise de CCD foram encontrados os resultados descritos na TABELA 5.

TABELA 5 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS EXTRATOS FRACIONADOS

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	AMOSTRAS							
	FOLHA				CAULE			
	FH	FC	FAE	FR	FH	FC	FAE	FR
Alcaloides	-	+	-	-	-	+	+	-
Cumarina	-	+	+	+	-	+	-	-
Esteroides	+	+	-	-	+	+	-	-
Flavonoides	-	-	+	-	-	-	+	-
Taninos	-	-	+	+	-	-	+	+
Terpenos	+	+	-	-	+	+	-	-

FONTE: O autor (2016)

NOTA: Fração hexânica (FH), Fração clorofórmio (FC), Fração Acetato de etila (FAE) e Fração residual (FR).

LEGENDA: (-) negativo; (+) positivo

A classe de metabólitos encontrados na triagem por CCD condiz com o esquema de separação proposto por Cequinel-Filho e Yunes (1997). Do extrato hexano pode-se obter esteroides e terpenos. Da fração clorofórmio pode-se extrair alcaloides, cumarina e terpenos. Da fração acetato de etila pode-se extrair flavonóide e taninos. Na espécie *Ocotea pulchella* o ensaio fitoquímico preliminar evidenciou a presença de metabólitos secundários podendo destacar alcaloides, flavonoides, taninos, esteroides, terpenos (ARAUJO, 2012). Os resultados obtidos no *screening* fitoquímico condizem com a literatura para o gênero *Ocotea*.

4.6 ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocotea nutans*

4.6.1 Rendimento do óleo essencial

O rendimento do óleo essencial de *Ocotea nutans*, obtido através de hidrodestilação por arraste de vapor d'água em aparelho de Clevenger foi de 0,54% (p/v) em relação as folhas. Assim, a cada 100 g de material vegetal seco das folhas foi possível obter 0,54 mL de óleo essencial.

A presença de células oleíferas é comum a família Lauraceae e foram bem evidenciadas nas fotomicrografias (item 4.1. e FIGURA 6E, 6F). A quantidade de ductos tem influência direta na produção de óleo essencial pela planta. O óleo essencial do gênero *Ocotea* começou a ser explorado com *Ocotea odorifera* que possui um rendimento de óleo nas folhas de 0,86%, ou seja, 0,86 mL de óleo essencial para cada 100 g de folha seca (CASTELLANI et al., 2006). Garrett e colaboradores (2010) utilizaram as folhas de *Ocotea notata* para obtenção do óleo essencial e obtiveram um rendimento de 0,12%, ou seja, 0,12 mL de óleo para cada 100 g de folha seca.

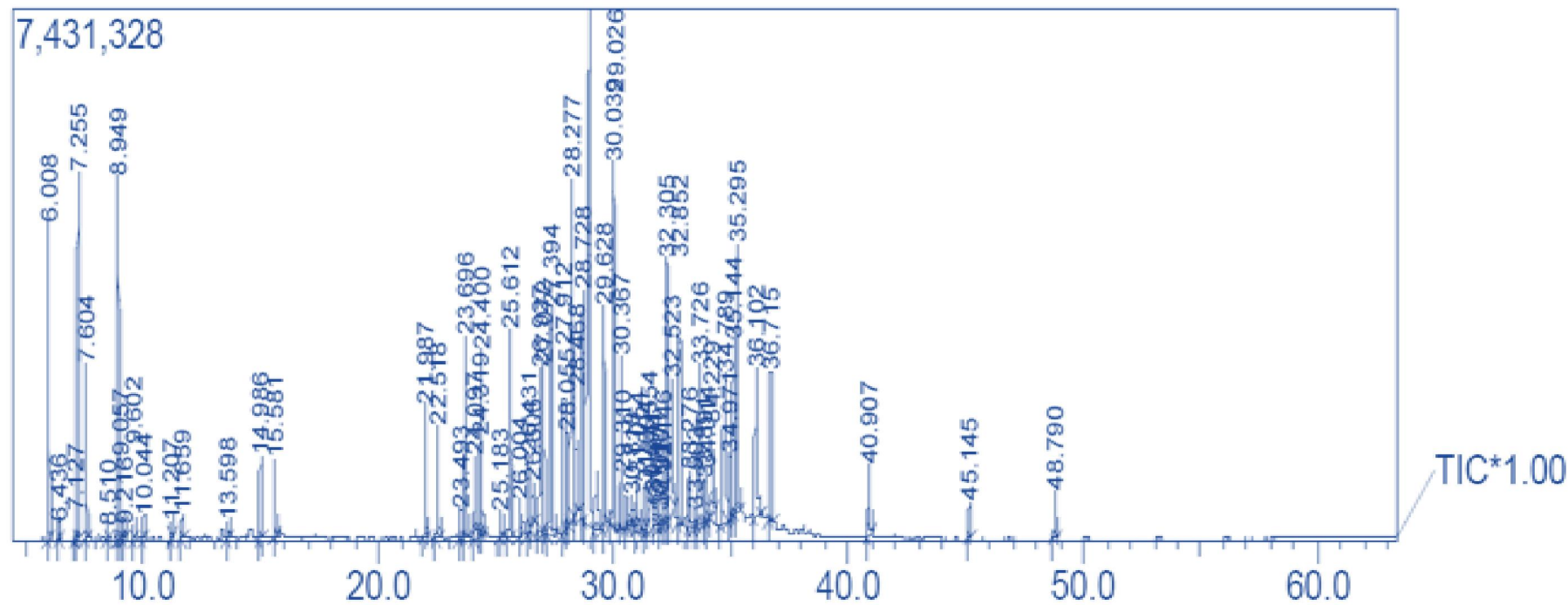
Ocotea odorifera é considerada e descrita como um dos melhores rendimentos de óleo essencial do gênero *Ocotea* e também foi das mais exploradas do gênero devido à presença da substância safrol, um dos compostos majoritários que seu óleo essencial possui. Sendo assim, o óleo de *Ocotea nutans* teve um bom rendimento, se comparado com o obtido em *Ocotea notata* (GARRETT et al., 2010), porém teve rendimento inferior se comparado com *Ocotea odorifera* (CASTELLANI et al., 2006).

4.6.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM)

O cromatograma obtido a partir da análise de CG/EM do óleo essencial das folhas de *Ocotea nutans* está representado na FIGURA 9. A identificação dos compostos foi efetuada por comparação com os espectros da biblioteca NIST 2014 (banco de dados do sistema) e por comparação com espectros de

referências bibliográficas descritos por Adams (2007). Os compostos químicos identificados na composição química do óleo essencial, por análise em CG/EM estão descritos na TABELA 6.

FIGURA 11 - ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DE *Ocotea nutans*



FONTE: O autor (2016).

TABELA 6 - COMPOSTOS QUÍMICOS IDENTIFICADOS NA ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Ocotea nutans*

(continua)

RT	ÁREA (%)	AI	RT (ADAMS, 2007)	AI (ADAMS, 2007)	KI (ADAMS, 2007)	COMPOSTO QUÍMICO IDENTIFICADO
6.008	2.12	935	5.85	932	939	α - pineno
6.436	0.09	950	6.26	946	954	Canfeno
7.127	0.16	975	6.91	969	975	Sabineno
7.255	2.81	980	7.04	974	979	β - pineno
7.604	1.13	993	7.43	988	990	Mirceno
8.510	0.07	1019	8.30	1014	1017	α - terpineno
8.949	3.24	1031	8.69	1024	1029	Limoneno
9.057	0.61	1034	8.76	1026	1031	Eucaliptol
9.216	0.09	1038	8.96	1032	1037	(z) β -ocimeno
9.602	0.09	1049	9.42	1044	1050	(E) β -terpineno
10.044	0.16	1060	9.78	1054	1059	γ - terpineno
11.207	0.10	1092	10.86	1085	1088	Terpinoleno
11.659	0.18	1104	11.32	1095	1096	Linalol
13.597	0.16	1149	13.28	1141	1146	Canfora
14.986	0.72	1182	14.66	1174	1177	Terpine-4-ol
15.581	0.70	1196	15.21	1186	1188	α - terpineol
21.987	1.32	1342	21.77	1335	1338	γ - elemeno
22.518	1.11	1354	22.33	1345	1348	α – cubebeno
23.493	0.33	1376	23.49	1374	1376	α – ylangeno
23.696	2.20	1381	23.49	1374	1376	α – copaeno
24.097	0.78	1390	24.05	1387	1388	β – burboneno
24.320	0.80	1395	24.04	1387	1388	β – cubebeno
24.400	1.94	1397	24.15	1389	1390	β – elemeno
25.183	0.27	1415	25.00	1409	1409	α – gurjuneno
25.610	2.47	1425	25.36	1417	1419	E – cariofileno
26.004	0.38	1435	25.90	1430	1432	β – copaeno
26.431	0.89	1445	26.20	1437	1439	α – guaiano
26.607	0.44	1449	26.39	1442	1444	6,9 - guaiadieno
26.927	2.09	1457	26.64	1448	1450	Cis- muurola 3,5 dieno
27.072	1.89	1460	26.82	1452	1454	α – humuleno
27.393	3.22	1468	27.07	1458	1460	Allo-aromadendreno

TABELA 6 – COMPOSTOS QUÍMICOS IDENTIFICADOS NA ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Ocotea nutans*

(conclusão)

27.913	1.71	1480	27.77	1475	1476	trans-cadina-1(6), 4-dieno
28.057	1.13	1484	27.91	1478	1479	γ -muuroleno
28.277	4.89	1489	28.15	1484	1485	D – germacreno
28.467	0.72	1493	28.37	1489	1490	β – selineno
28.727	3.09	1500	28.53	1493	1493	Trans-muurola-4(14),5 dieno
29.026	11.41	1507	28.83	1500	1500	Bicyclogermacreno
29.310	1.01	1514	29.29	1511	1512	δ -amorfeno
29.628	3.13	1522	29.35	1413	1513	γ - cadineno
30.367	1.84	1540	30.18	1533	1534	<trans> cadina 1,4dieno
30.570	0.31	1545	30.33	1537	1537	α – cadineno
30.818	0.24	1551	30.62	1544	1545	α – calacoreno
31.053	0.62	1557	30.78	1548	1549	Elemol
31.393	0.44	1566	31.24	1559	1561	B – germacreno
31.553	0.56	1570	31.32	1561	1563	E – nerolidol
31.823	0.28	1576	31.56	1567	1568	Palustrol
32.147	0.53	1584	31.85	1574	1575	Germacreno – D - 4 - ol
32.305	3.71	1588	31.96	1577	1578	Espatuleno
32.523	1.74	1594	32.16	1582	1583	Cariofileno óxido
32.850	2.45	1602	32.50	1590	1590	Globulol
33.277	0.80	1613	32.99	1602	1602	Ledol
33.726	2.50	1625	33.60	1618	1619	Cubenol <1,10-di-epi>
34.230	0.72	1638	34.25	1635	1636	<cis>Cadin-4-en 7-ol
34.790	3.18	1653	34.61	1644	1646	α – Muurolol
34.970	0.77	1657	35.07	1656	1658	Valerianol
35.143	2.29	1662	35.25	1661	1662	<dihydro> Eudesmol
35.297	3.73	1666	35.47	1667	1668	Bisabol-11-ol <(E)>
45.147	0.38	1939	45.06	1933	1934	Ent – rosa-5,15-diene
48.790	0.55	2043	48.66	2042	2043	Kaureno

FONTE: O autor (2016)

LEGENDA: RT (tempo de retenção); AI (índice aritmético); KI (índice de Kovats)

Encontraram-se 68 compostos químicos, dos quais foram identificados 59 terpenos na análise da composição do óleo essencial de *Ocotea nutans*,

representando 87,29% do total dos componentes presentes no óleo essencial. Do total identificado, 11 (10,06%) são monoterpenos, 5 são monoterpenos oxigenados (2,37%), 27 são sesquiterpenos (50,05%), 14 são sesquiterpenos oxigenados (23,88%) e 2 são diterpenos (0,93%). Os 9 compostos não identificados não tiveram os picos de massas descritos na biblioteca e também não foram identificados através dos índices de massas constantes em Adams (2007).

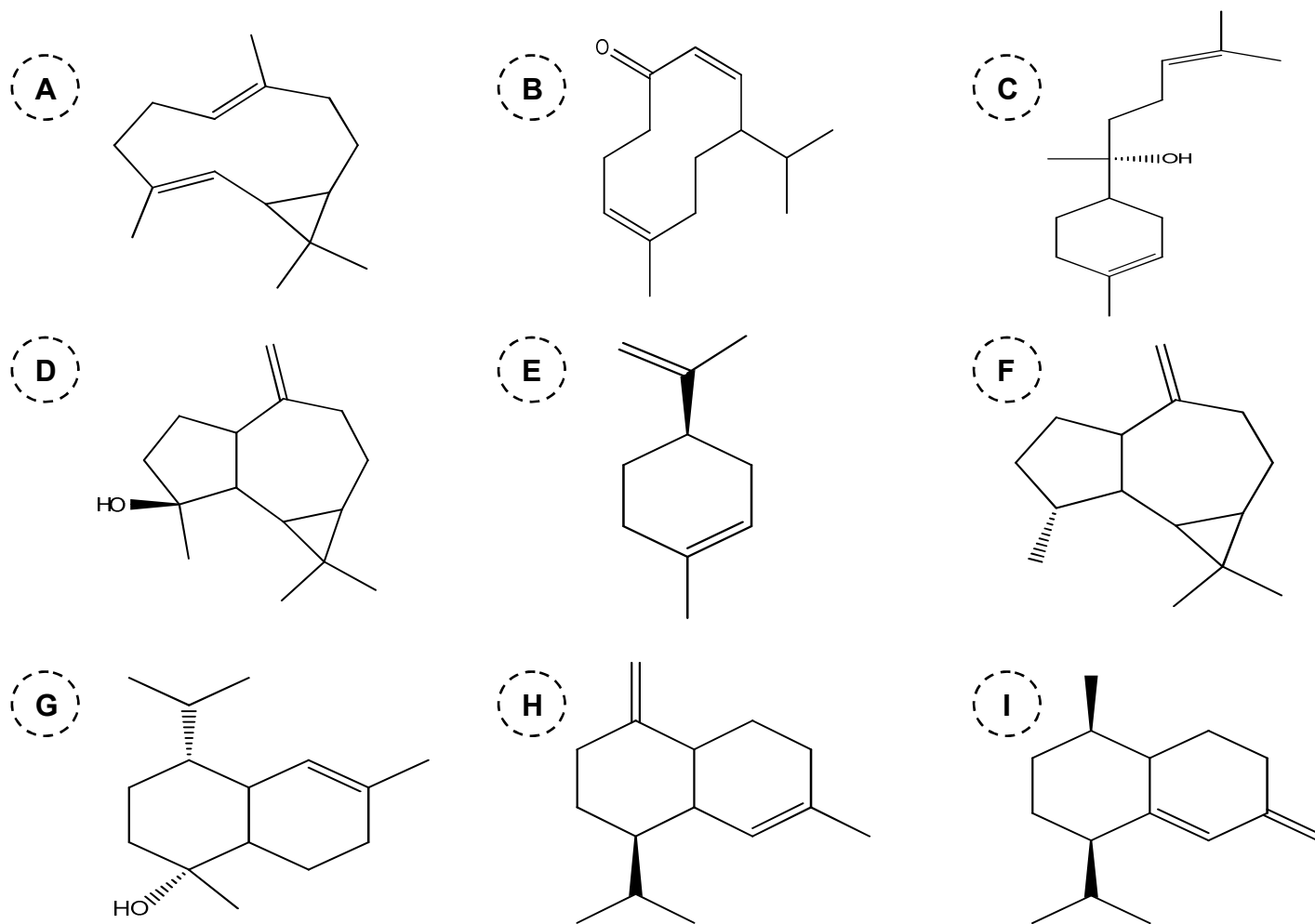
O composto majoritário identificado no óleo essencial de *Ocotea nutans* foi o biciclogermacreno (11,41%), composto frequentemente citado em atividades fungicidas (SILVA et al., 2007). O biciclogermacreno, cuja estrutura química está representada na FIGURA 11A, tem se mostrado eficiente em atividades microbiológicas (CONSTANTIN et al., 2001). O D-germacreno (FIGURA 11B) apresentou atividade anti-cancer (SYLVESTRE et al., 2006), atividade antimicrobiana (DEUSCHLE et al., 2007) e insetifuga (FRANSCESCATO, 2007). O bisabol-11-ol (FIGURA 11C) apresenta atividade farmacológica conhecida e é utilizado como anti-inflamatório (ROBBERS et al., 1997), cicatrizante e também antimicrobiana (DARRA et al., 2008). O espatulenol (FIGURA 11D) possui propriedades antimicrobianas (VEIGA-JUNIOR et al. 2002; LIMBERGER et al. 2004). O limoneno (FIGURA 11E) tem se mostrado eficiente em atividades anti-inflamatórias (HIROTA et al., 2010), gastroprotetora (ROZZA et al., 2010), atividade quimiopreventiva para câncer de fígado, pulmão, pele e mama (CROWELL, 1997) e atininoceptiva (AMARAL et al., 2007; MURALI; SARAVANAN, 2012). O allo-aromadendreno (FIGURA 11F) possui atividade fungicida (SCALCO et al., 2014).

Não foi encontrado na literatura relatos de atividades biológicas para o α – Muurolol (FIGURA 11G), γ - cadineno (FIGURA 11H) e Trans-muurola-4(14),5 dieno (FIGURA 11I).

Há relatos que o D-germacreno pode-se converter em derivados muurolenos e cadinenos, os quais ainda podem se oxidar originando cadinóis e outros derivados (BULOW; KONIG, 2000; VALTER et al., 2008). Essas reações podem ocorrer sob temperaturas elevadas, como a extração ou em temperatura

ambiente (TOYOTA et al.,1996), que promovem o aparecimento de vários compostos derivados da oxigenação, abertura de anel ou rearranjo de moléculas (BULOW; KONIG, 2000).

FIGURA 12 - ESTRUTURA MOLECULAR DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocotea nutans*



FONTE: O autor (2016)

NOTA: **A:** Biciclogermacreno; **B:** D-germacreno; **C:** Bisabol-11-ol; **D:** Espatulenol; **E:** Limoneno; **F:** Allo aromadendreno; **G:** α – Muurolol; **H:** γ – cadineno; **I:** Trans-muurolo-4(14),5 dieno.

4.7 PERFIS DAS AMOSTRAS POR CLAE/DAD

Na TABELA 7 observam-se os dados obtidos das amostras do extrato bruto e frações das folhas submetidas à CLAE/DAD.

TABELA 7 - TEMPO DE RETENÇÃO DOS SINAIS MONITORADOS NAS ANÁLISES DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DA FOLHA DE *Ocotea nutans*

AMOSTRA	PICO	λ_{Abs} (nm)	RT (min)
EB	1	268; 298; 339	14,29
	2	290	14,97
	3	270; 298; 337	15,81
	4	234; 265	20,02
	5	228; 268; 314	28,60
FC	1	234; 265	20,02
FAE	1	268; 298; 339	14,29
	2	290	14,97
	3	270; 298; 337	15,81
	4	256; 349	18,95
FR	1	269; 342	13,63
	2	270; 338	14,46
	3	270; 239	15,04

FONTE: O autor (2016).

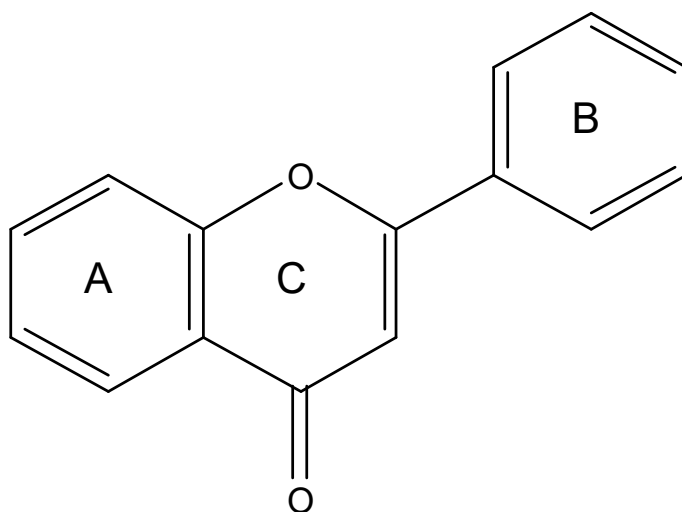
LEGENDA: λ_{Abs} : Bandas de absorção (nm); RT: Tempo de Retenção (min)

NOTA: Extrato bruto (EB); Fração clorofórmio (FC); Fração acetato de etila (FAE); Fração residual (FR).

Nos cromatogramas das folhas da espécie *Ocotea nutans* foi verificado no extrato bruto, cinco picos cromatográficos com tempo de retenção diferentes (FIGURA 13). Na fração acetato de etila (FIGURA 15) observa-se pelas bandas de absorção (λ_{Abs}) que os picos 1, 2 e 3 são os mesmos que aparecem no extrato bruto da folha. Na fração clorofórmio (FIGURA 14) observa-se pelas bandas de absorção (λ_{Abs}) que o pico apresentado no cromatograma é o pico 4 representado no extrato bruto da folha. Na fração residual (FIGURA 16) da folha observa-se pelas bandas de absorção (λ_{Abs}), que este possui semelhança com as bandas dos picos 1, 2 e 3 do extrato bruto da amostra. Os espectros 1, 3 e 5 possuem características de flavonoides (FIGURA 12), possuindo duas bandas de absorção

máxima, uma relacionada com os anéis B e C, em 300 a 380 nm (banda I) e a segunda banda relacionada ao anel A, em 230 a 280 nm. Os espectros da classe dos flavonóides variam conforme oxigenação do composto, provocando desvios das bandas de absorção (MABRY et al., 1970).

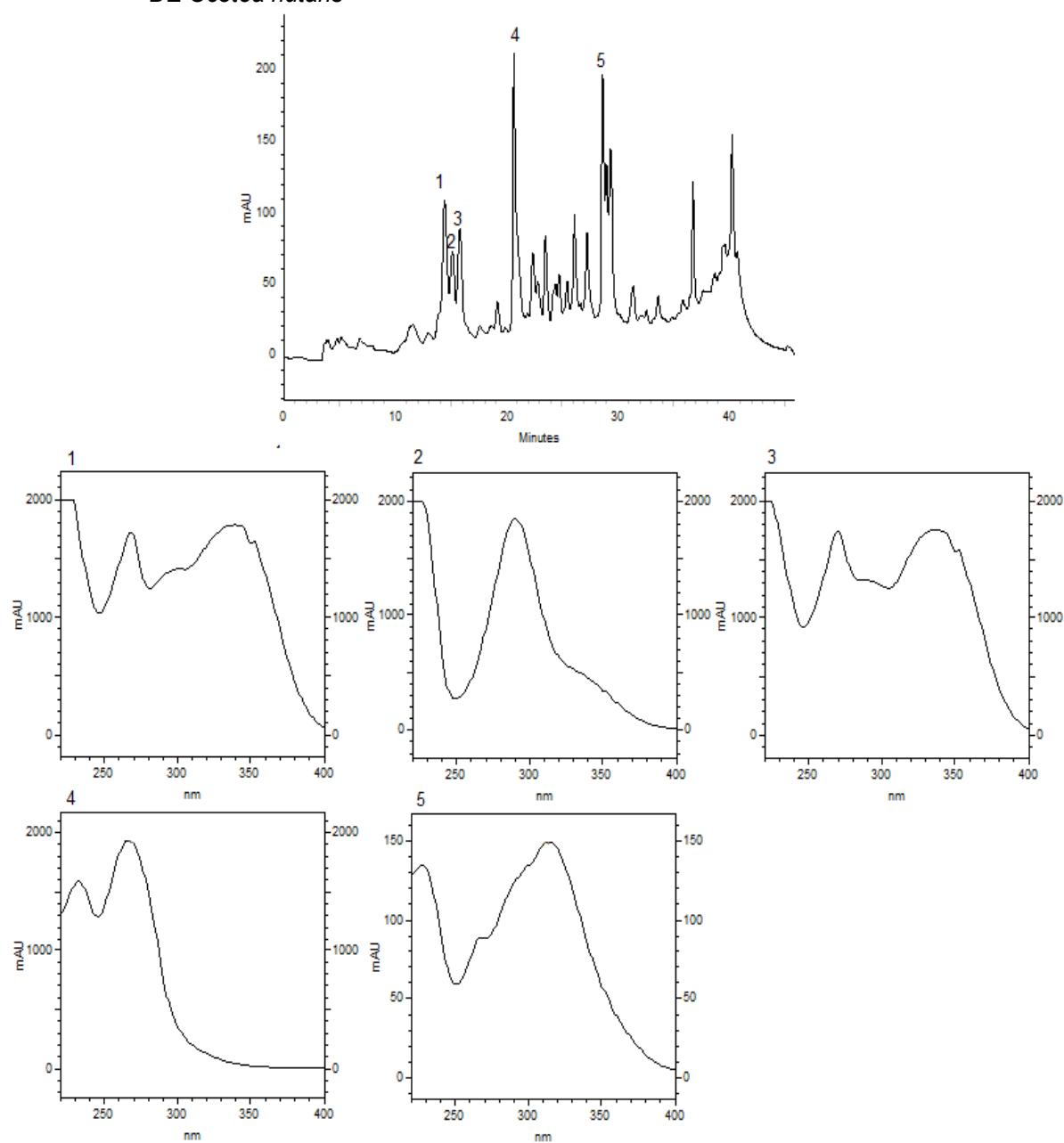
FIGURA 13 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS FLAVONOIDES



FONTE: O autor (2016)

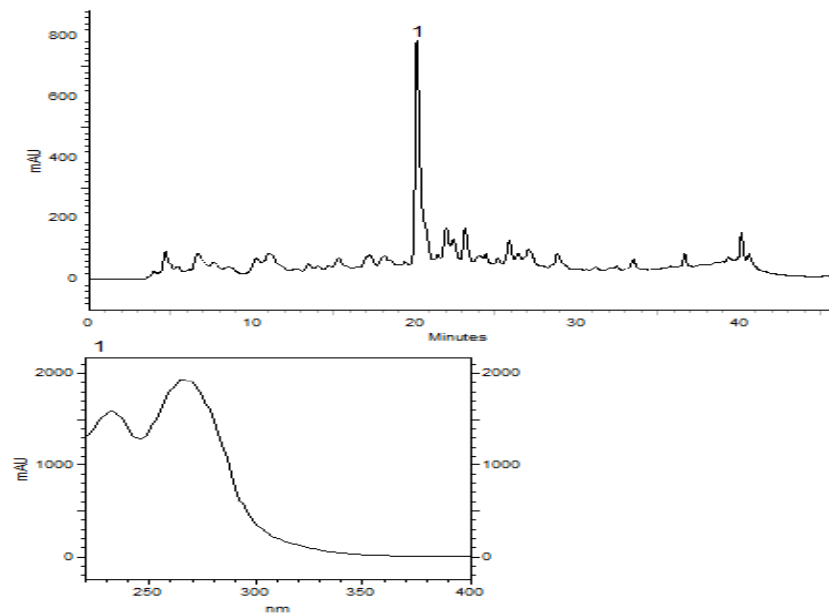
Os picos cromatográficos presentes no extrato bruto também foram identificados nas frações clorofórmio e acetato de etila, demonstrando que o fracionamento líquido-líquido é eficiente na separação dos constituintes químicos.

FIGURA 14 - CROMATOGRAMA E ESPECTROS DE UV DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *Ocotea nutans*



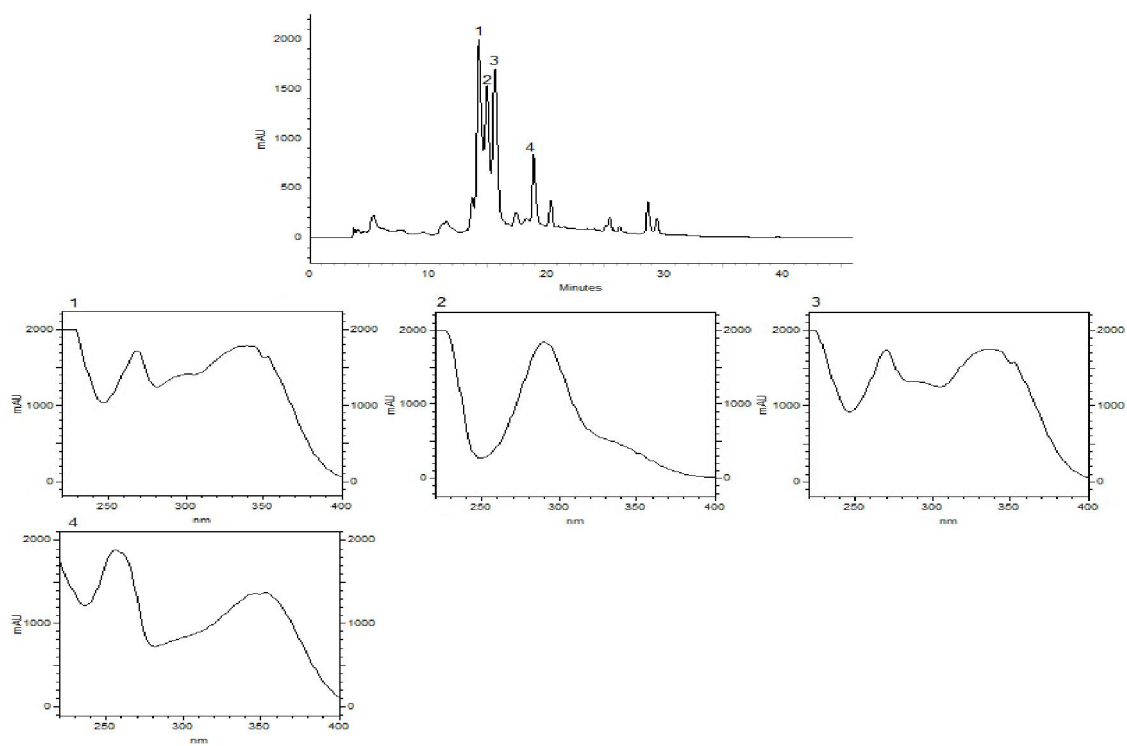
FONTE: O autor (2016)

FIGURA 15 - CROMATOGRAMA E ESPECTROS DE UV DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DAS FOLHAS DE *Ocotea nutans*



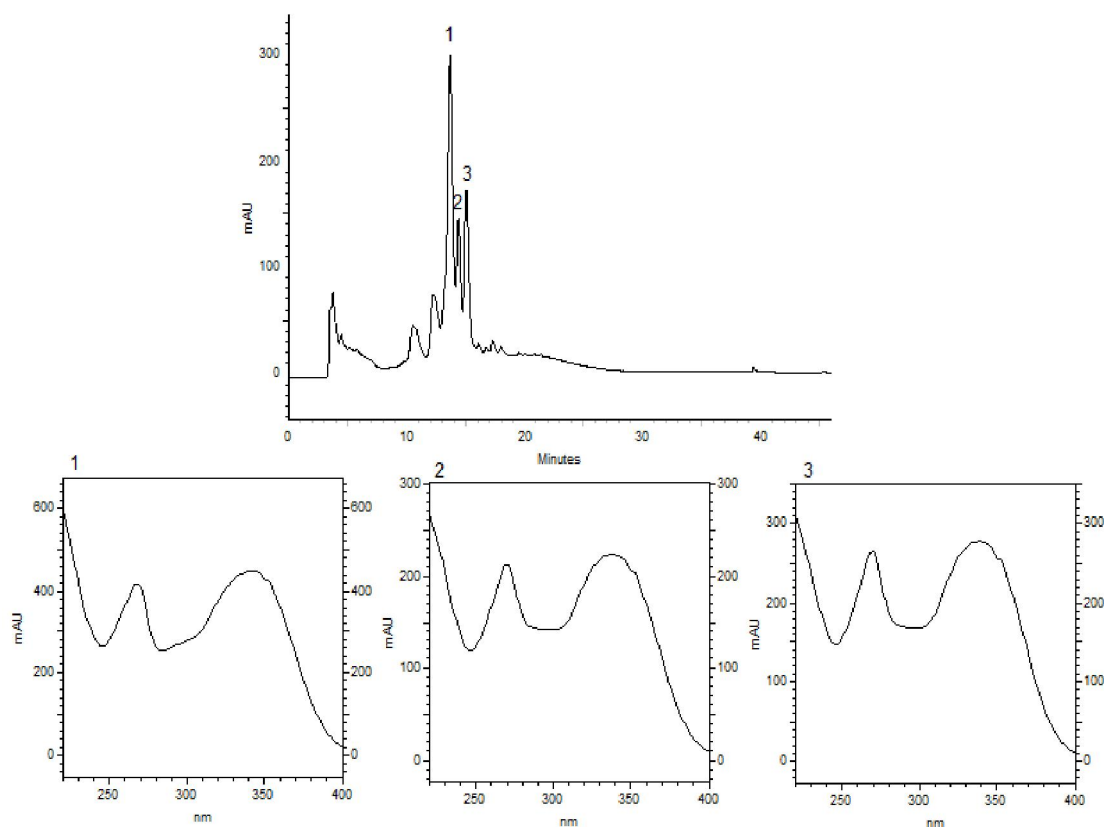
FONTE: O autor (2016)

FIGURA 16 - CROMATOGRAMA E ESPECTROS DE UV DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE *Ocotea nutans*



FONTE: O autor (2016)

FIGURA 17 - CROMATOGRAMA E ESPECTROS DE UV DA FRAÇÃO RESIDUAL DAS FOLHAS DE *Ocotea nutans*



FONTE: O autor (2016)

Analisando os cromatogramas do caule, é possível verificar que estes possuem uma composição química diferente do extrato bruto das folhas. Foram monitorados no extrato bruto do caule (FIGURA 17), dois picos cromatográficos, o primeiro característico da fração clorofórmio (FIGURA 18) e o segundo pertencente à fração acetato de etila (FIGURA 19). Nenhum dos espectros de ultravioleta dos picos cromatográficos analisados do caule apresenta característica de espectros de flavonoides. O tempo de retenção e as bandas de absorção podem ser analisados na TABELA 8. A fração residual do caule não apresentou nenhum pico cromatográfico.

TABELA 8 - TEMPO DE RETENÇÃO DOS SINAIS MONITORADOS NA ANÁLISE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DE *Ocotea nutans*

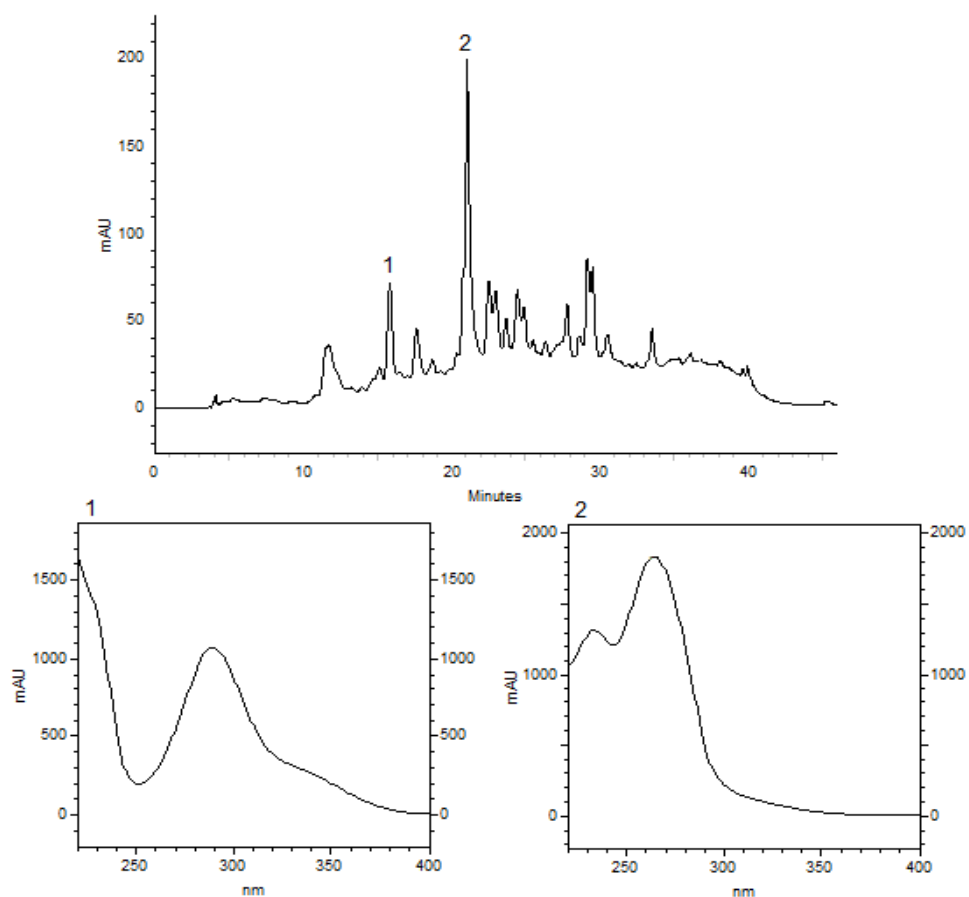
MOSTRA	PICO	λ_{Abs} (nm)	RT (min)
EB	1	289	15,46
	2	230; 266	20,23
FC	1	230; 266	20,23
FAE	1	289	15,46

FONTE: O autor (2016)

LEGENDA: λ_{Abs} : Bandas de absorção (nm); RT: Tempo de Retenção (min)

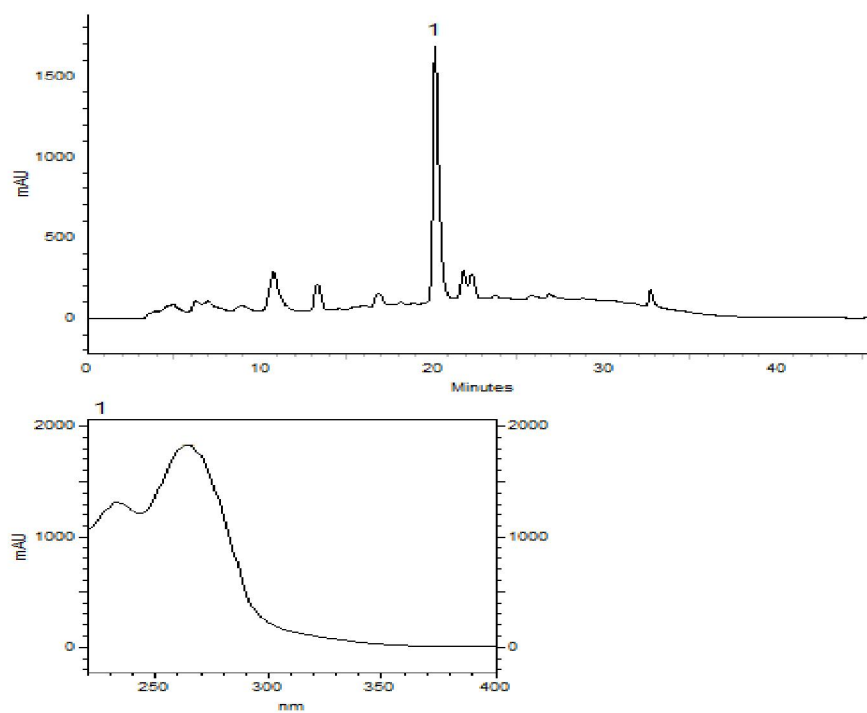
NOTA: Extrato bruto (EB); Fração clorofórmio (FC); Fração acetato de etila (FAE)

FIGURA 18 - CROMATOGRAMA E ESPECTROS DE UV DO EXTRATO BRUTO DO CAULE DE *Ocotea nutans*



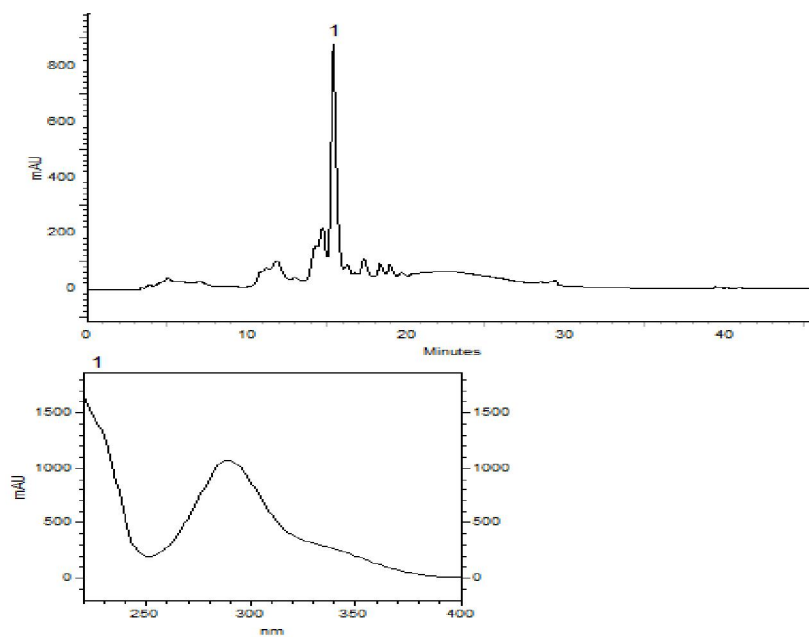
FONTE: O autor (2016)

FIGURA 19 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE UV DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DO CAULE DE *Ocotea nutans*



FONTE: O autor (2016)

FIGURA 20 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE UV DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO CAULE DE *Ocotea nutans*



FONTE: O autor (2016)

Mais estudos devem ser realizados com estas amostras para identificar os constituintes químicos presentes. Os cromatogramas demonstram que o particionamento por polaridade crescente é efetivo na separação das substâncias, podendo auxiliar no isolamento, quantificação e monitoramento da espécie por estes picos cromatográficos.

4. ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.8.1 Ensaio de toxicidade *in vitro*

4.8.1.2 Atividade tóxica em *Artemia salina*

A concentração letal (CL_{50}) do dodecilsulfato de sódio (SDS) em *Artemia salina* deve estar contida na faixa entre 13,1 e 30,9 $\mu\text{g/mL}$ em 24 horas (VEIGA; VITAL, 2002), o que foi confirmado nos resultados obtidos: $CL_{50 \text{ SDS } 24\text{h}} = 24,49 \mu\text{g/mL}$. Esta constatação demonstra que a sensibilidade dos indivíduos está padronizada, o que reduz a possibilidade de gerar resultados falsamente exacerbados ou atenuados. A avaliação de toxicidade aguda em *Artemia salina* estabelece parâmetro para a espécie, uma vez que não foram encontrados relatos de ensaios ecotoxicológicos anteriores para se estabelecer comparações.

Baseando-se em Meyer et al. (1982), podemos considerar tóxicas amostras que apresentam $CL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$, ou seja, quase todas as amostras testadas. Porém, em Amarante et al. (2011), foi descrita uma relação entre o grau de toxicidade em *Artemia salina* e a correlação da CL_{50} mais detalhada: a) baixa toxicidade ($CL_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$); b) moderada toxicidade ($100 \mu\text{g/mL} < CL_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$); c) alta toxicidade ($CL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$). Os resultados obtidos no ensaio em *Artemia salina* estão descritos na TABELA 9.

TABELA 9 - TOXICIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL EM *Artemia salina*

AMOSTRA	CL ₅₀ µg/mL	INTERVALO DE CONFIANÇA 95%
Extrato Bruto Folhas	54,12	37,92-77,23
Hexano Folhas	201,29	175,93-230,30
Clorofórmio Folhas	410,42	372,77-451,87
Acetato de Etila Folhas	649,55	533,23-791,24
Residual Folhas	> 1000	-
Óleo Essencial Folhas	62,53	51,42-76,04
Extrato Bruto Caules	215,44	157,49-294,72
Hexano Caules	104,77	66,23-164,78
Clorofórmio Caules	215,44	131,03-354,25
Acetato de Etila Caules	666,39	365,39-1214,23
Residual Caules	> 1000	-

FONTE: O autor (2016)

Apenas as frações residuais das folhas e caules não ocasionaram letalidade nos indivíduos no período avaliado, podendo ser considerados livres de toxicidade aos organismos avaliados. As frações acetato de etila das folhas e caules foram consideradas de baixa toxicidade, levando em consideração a classificação de Amarante e colaboradores (2011). As frações hexano das folhas e caule, extrato bruto dos caules e clorofórmio de ambas as partes da planta permaneceram enquadradas como moderadamente tóxicas (AMARANTE et al., 2011). O extrato bruto das folhas, seguido pelo óleo essencial, apresentou a maior toxicidade, e pode ser considerado altamente tóxico (AMARANTE et al., 2011). À alta toxicidade dos extratos brutos se dá pelo somatório dos constituintes das frações, pelos resultados das frações, aparentemente a toxicidade está mais

pronunciada nas frações mais apolares. Portanto, a maior parte das amostras foi considerada de moderada a alta toxicidade.

Em Araújo (2012), as frações clorofórmio, acetato de etila e remanescente hidroalcoólica das folhas de *Ocotea pulchella* apresentaram atividade tóxica capaz de provocar mortalidade do microcrustáceo, sugerindo bioatividade. Estudo utilizando os frutos da espécie *Ocotea heterochroma* (CUCA et al., 2009) apresentaram atividade para o extrato bruto etanólico, fração butanoica e com a fração benzeno sendo considerada com boa bioatividade.

Silva e colaboradores (2010) realizaram um estudo biomonitorado do extrato bruto da folha, casca e frutos de várias espécies. A espécie *Ocotea minarum* não apresentou bioatividade para os extratos da folha e da casca, porém apresentou alta toxicidade para os frutos da espécie com CL_{50} de 263,53 $\mu\text{g/mL}$. A espécie *Ocotea suaveolens* não apresentou toxicidade do extrato bruto das folhas e do caule. Já a espécie *Ocotea velloziana* apresentou atividade tóxica com uma CL_{50} de 555,94 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato bruto da casca. Garrett e colaboradores (2007) realizaram um bioensaio com o óleo essencial de *Ocotea notata* tendo sua CL_{50} de 2,73 $\mu\text{g/mL}$, sendo considerado extremamente tóxico.

4.8.1.2 Atividade hemolítica *in vitro*

Os resultados da atividade hemolítica *in vitro* das amostras analisadas, extratos brutos e frações das folhas e caules e do óleo essencial, estão descritos na TABELA 10.

O teste de atividade hemolítica em eritrócitos de carneiro foi empregado para a avaliação da atividade hemolítica dos extratos, frações e óleo essencial da espécie *Ocotea nutans*. As concentrações estudadas variam de 1000 a 100 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando que somente a fração clorofórmio do caule, não apresentou relação dose dependência uma vez que não foi observada uma relação direta ou inversamente proporcional entre o aumento de concentrações e intensidades de hemólise. As outras amostras testadas apresentaram relação dose dependência, isto é, aumentando a concentração da solução dos extratos é observado o

aumento da atividade de hemólise. Analisando os resultados obtidos observa-se que o extrato bruto e fração hexano do caule e da folha apresentam alto potencial hemolítico. O óleo essencial é o que possui o maior potencial hemolítico no teste, sendo, portanto superior a hemólise (branco) nas concentrações de 200 a 1000 µg/mL.

A atividade hemolítica *in vitro* pode ser considerada um bom teste de triagem de toxicidade de extratos e frações vegetais visto que através da avaliação da estabilidade mecânica da membrana do eritrócito de carneiro podemos caracterizar os danos que o composto provoca (hemólise) e correlacionar a toxicidade dos extratos ou frações com potencial de atividade terapêutica (MURADOR; DEFFUNE, 2007; SCHULZ et al., 2005).

TABELA 10 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E DO ÓLEO ESSENCIAL DA FOLHA DE *Ocotea nutans*

AMOSTRA/ CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA (µg/mL)		%HEMOLISE FOLHA	TESTE DE DUNCAN FOLHA	%HEMOLISE CAULE	TESTE DE DUNCAN CAULE
CONTROLE	-	100	b	100	a
EB	100	17,69	f g h i	7,57	i
	200	40,65	e	43,17	c d
	500	44,41	e	71,09	b
	1000	53,95	d	101,05	a
FH	100	16,10	g h i	10,03	h i
	200	22,44	f g	50,49	c
	500	54,01	d	77,93	b
	1000	172,83	a	94,55	a
FC	100	16,20	g h i	6,23	i
	200	20,68	f g h	8,41	i
	500	26,57	f	11,87	h i
	1000	91,17	c	44,98	c d
FAE	100	9,94	i	10,40	h i
	200	11,48	h i	13,05	h i
	500	12,20	h i	33,76	e
	1000	15,32	g h i	40,78	d e
FR	100	10,82	h i	11,39	h i
	200	11,05	h i	13,87	h i
	500	11,61	h i	14,63	h i
	1000	13,25	g h i	18,63	h
CONTROLE OE	-	100	d	-	-
OE	100	103,37	c	-	-
	200	128,93	c	-	-
	500	189,13	b	-	-
	1000	281,08	a	-	-

FONTE: O Autor (2016)

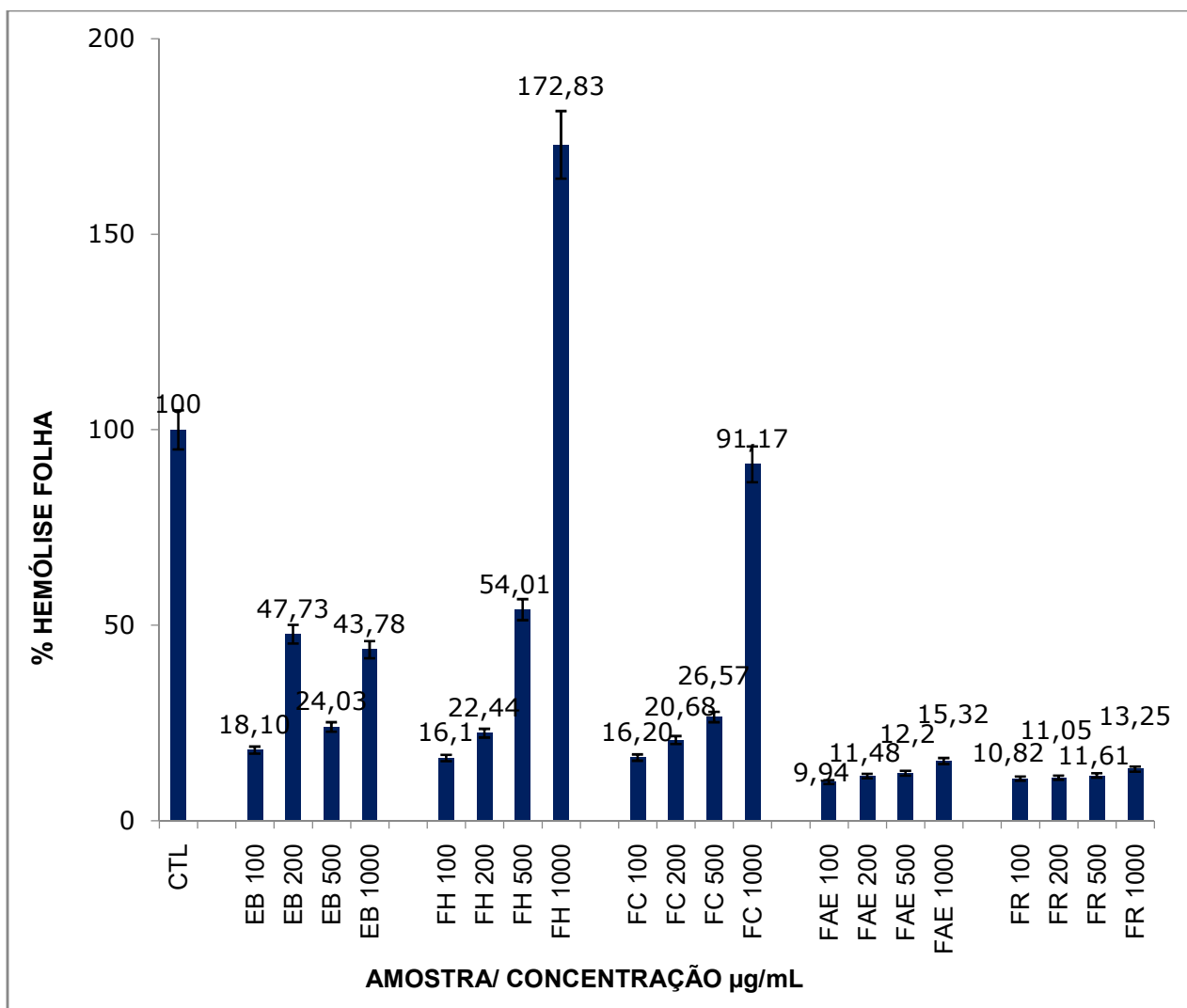
NOTA (1): Extrato bruto (EB); fração hexano (FH); fração clorofórmio (FC); fração acetato de etila (FAE); fração residual (FR).

(2): Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente.

Para a atividade hemolítica da folha as frações hexano e clorofórmio apresentaram a maior porcentagem de hemólise em comparação com o controle. Os resultados demonstraram que a fração hexano na concentração de 1000

$\mu\text{g/mL}$ possui hemólise superior ao controle, seguidos pela fração clorofórmio na concentração de $1000 \mu\text{g/mL}$. Demonstrando que a FH da folha e a FC da folha possuem alta atividade hemolítica. Pode-se observar essa atividade no GRÁFICO 1.

GRÁFICO 1 - COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DA FOLHA DE *Ocotea nutans*



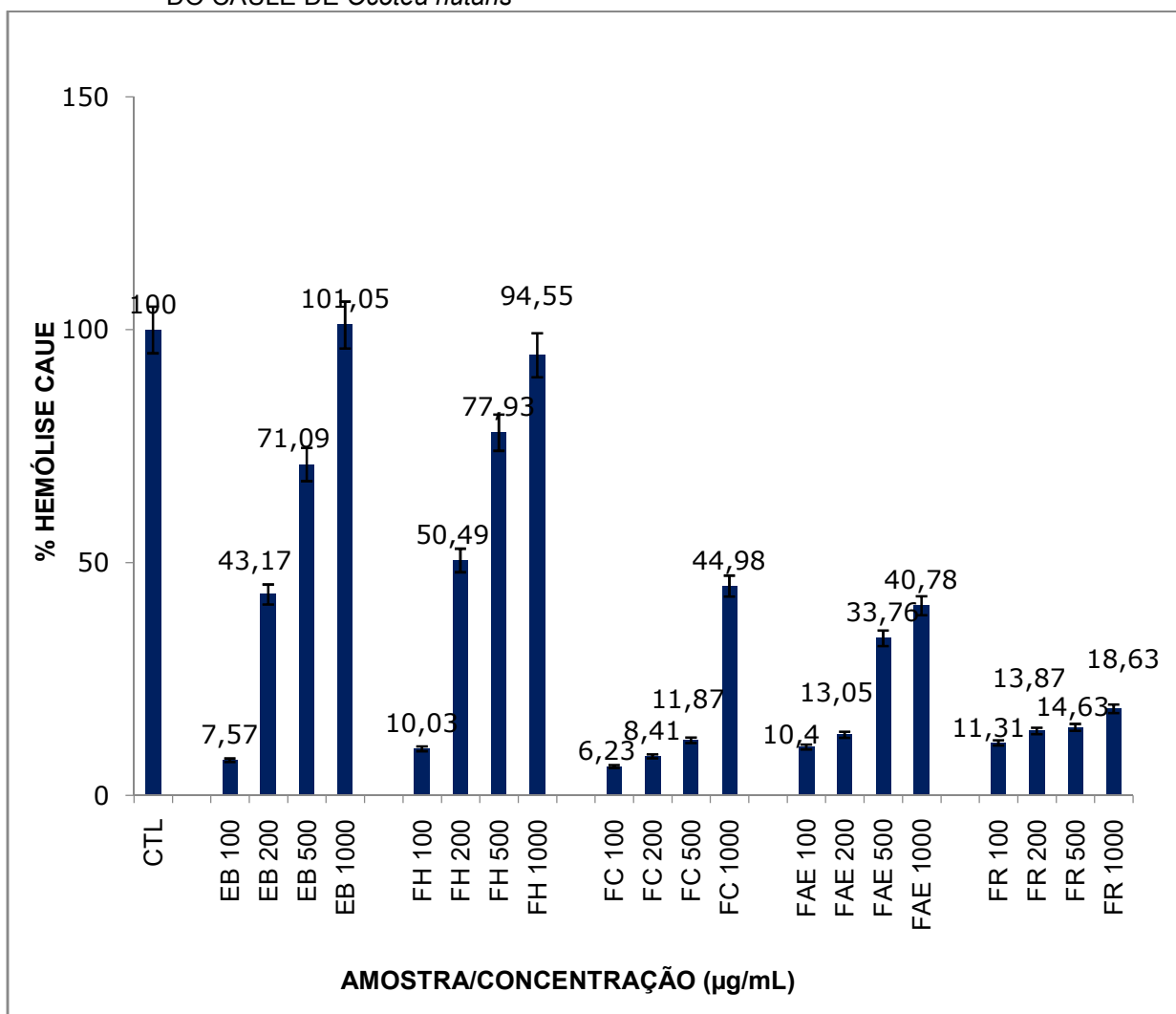
FONTE: O Autor (2016)

NOTA: Controle (CTL); Extrato bruto (EB); Fração Hexânica (FH), Fração Clorofórmio (FC), Fração Acetato de Etila (FAE), Fração residual (FR). Considere o controle como hemólise total, sendo 100%.

Para a atividade hemolítica do caule o extrato bruto e a fração hexano apresentaram a maior porcentagem de hemólise em comparação com o controle.

Os resultados demonstraram que o extrato bruto na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ possui hemólise superior ao controle, seguidos pela fração hexano na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Demonstrando que a EB do caule e a FH do caule possuem alta atividade hemolítica. Pode-se observar essa atividade no GRÁFICO 2.

GRÁFICO 2 - COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DE *Ocotea nutans*

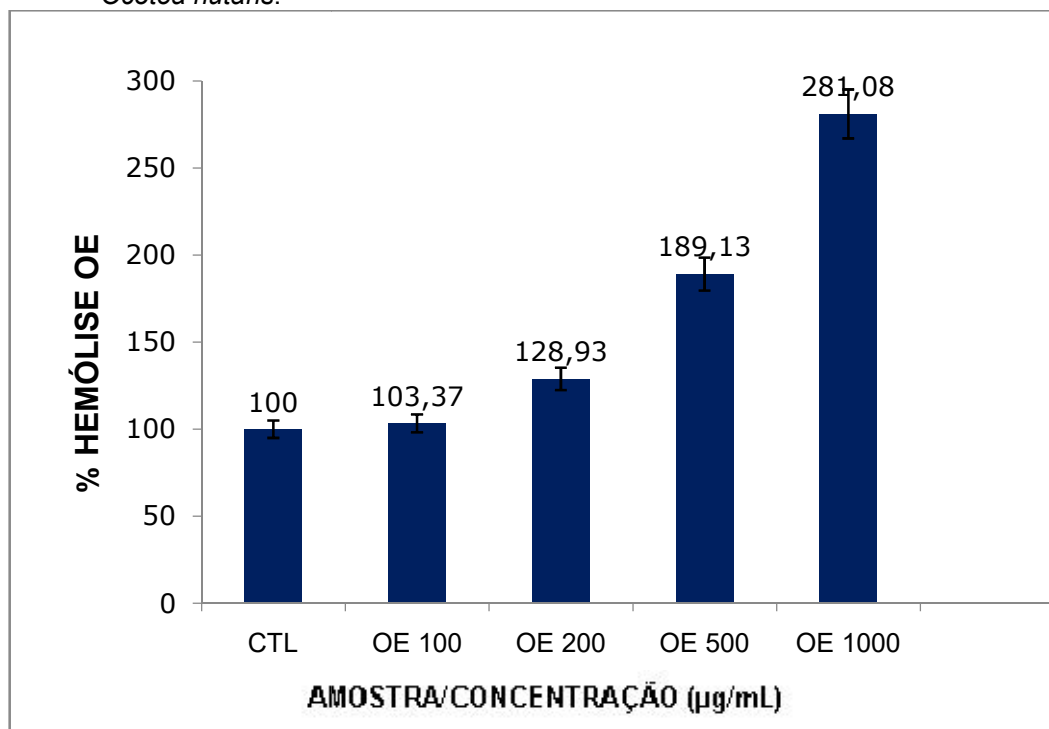


FONTE: O autor (2016)

NOTA: Controle (CTL); Extrato Bruto (EB), Fração Hexânica (FH), Fração Clorofórmio (FC), Fração Acetato de Etila (FAE), Fração residual (FR). Considere o controle como hemólise total, sendo 100%.

Para o óleo essencial foi observado a presença de atividade hemolítica acima do controle de hemólise. O óleo essencial da espécie *Ocotea nutans* é composto de derivados de terpenóides. Os terpenos abrangem uma grande variedade de substâncias de origem vegetal e tem comprovada importância como defensivos das plantas e estão relacionados com toxicidade. A concentração de 1000 µg/mL apresentou-se de maior atividade hemolítica, possivelmente pela maior concentração de óleo na solução. Em comparação com o controle, pode-se afirmar que todas as concentrações do óleo essencial da espécie foram consideradas hemolíticas. Pode-se observar a comparação da atividade no GRÁFICO 3.

GRÁFICO 3 - COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO ÓLEO ESSENCIAL (OE) DE *Ocotea nutans*.



FONTE: O Autor (2016)

NOTA: Óleo essencial (OE). Considere o controle como hemólise total, sendo 100%.

As plantas contêm princípios ativos responsáveis pelas propriedades terapêuticas e a ação tóxica de alguns metabólitos secundários é bem evidenciada. A atividade tóxica da fração clorofórmio da folha pode ter correlação

com alguns alcaloides, que mesmo em pequenas quantidades, são substâncias potencialmente tóxicas (DEWICK, 2002). A presença de taninos conferem a planta atividades tóxicas e aglutinantes (MONTEIRO et al., 2005; SILVA, 1999).

4.8.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Conforme observado na TABELA 11, ao avaliar a atividade antibacteriana dos extratos e frações e também do óleo essencial, foi observado que há um potencial inibitório contra micro-organismos gram-positivos, e uma baixa atividade frente a bactérias gram-negativas, com exceção a *E. coli*. Há sugestão que os compostos terpenoides e seus derivados oxigenados apresentem uma inibição mais efetiva sobre os micro-organismos gram-positivos que em gram-negativos (TIWARI et al., 2009)

A FHC foi a mais efetiva na inibição bacteriana chegando a uma CIM de 125 µg/mL para *E. faecalis* e *E. coli*, valor também da CIM do EBC para *E. faecalis*.

A CIM de extratos brutos, frações do caule e folhas e do óleo essencial da espécie *Ocotea nutans* estão representados na TABELA 11.

Os valores obtidos das CIMs foram classificados em bom potencial inibitório (até 100 µg/mL); moderada atividade inibitória (entre 100-500 µg/mL); fraca atividade inibitória (entre 500-1000 µg/mL) e inativos (maiores que 1000 µg/mL) (TANAKA et al., 2005; AYRES et al., 2008; SANTOS et al., 2008).

TABELA 11 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MINIMA(CIM) DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocotea nutans*

Micro-organismo	Extratos e frações da folha (µg/mL)					Extratos e frações do caule (µg/mL)					OE
	EB	FH	FC	FAE	FR	EB	FH	FC	FAE	FR	OE
Gram-positivo											
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	500	500	500	250	1000	125	125	1000	250	500	500
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1000	1000	500	1000	-	250	250	1000	250	-	1000
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	1000	500	1000	500	-	500	500	1000	250	1000	1000
Gram-negativo											
<i>E. coli</i> ATCC 25922	500	500	500	1000	1000	250	125	1000	250	1000	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1000	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	1000	1000	-	-	-	1000	1000	1000	1000

FONTE: O autor (2016)

NOTA: **(EB)** Extrato Bruto, **(FH)** Fração Hexano, **(FC)** Fração Clorofórmio, **(FAE)** Fração Acetato de Etila, **(FR)** Fração Residual, **(OE)** Óleo essencial, (-) CIM superior a 1000 µg/mL para o extrato bruto e frações.

A atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais foi comprovada em vários estudos realizados em países que possuem uma flora diversificada (HOLETZ et al., 2002; ADWAN et al., 2008; MULYANINGSIH et al., 2011). Segundo Michelin et al. (2005) os antibióticos vegetais possuem uma estrutura química que difere daquela dos antibióticos derivados de micro-organismos ou sintéticos, podendo interferir no metabolismo de patógenos, ativando ou bloqueando reações e a síntese enzimática, na alteração de estruturas das membranas ou em outras estruturas celulares. Porém, desde o advento dos antibióticos, o uso de derivados de plantas como antimicrobianos tem sido incipiente (COWAN, 1999).

O gênero *Ocotea* representa um grupo de plantas que apresentam em sua composição compostos bioativos com atividade antimicrobiana, sendo que a espécie *Ocotea nutans* não foi a única a ser estudada. Estudos realizados com a espécie *Ocotea odorifera*, também utilizando o método de CIM para os extratos brutos da folha e da casca (ROGATTO et al., 2014), demonstraram sensibilidade antibacteriana frente as bactérias *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e ausências da atividade para *E. coli* e de atividade fungicida para *C. albicans*. Estudo realizado com o óleo essencial de *Ocotea odorifera* (CANSIAN et al., 2010) apresentou atividade antibacteriana contra *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *K. pneumoniae*, sendo considerado pelo autor como mais efetivo as bactérias gram-negativas comparando as concentrações de inibição.

Outra espécie utilizada em ensaio antibacteriano foi a *Ocotea notata* (GARRETT et al., 2007), onde atividade do óleo essencial da espécie apresentou um poder de inibição para *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*.

Cowan, em 1999, numa revisão sistemática enumerou os principais elementos antimicrobianos encontrados na natureza e a sua ação contra diferentes micro-organismos. Observou que os fenóis e polifénóis, flavonoides e terpenos são eficazes ativos contra micro-organismos, especialmente bactérias, já que seus efeitos, ainda não totalmente descritos, podem ativar ou inativar compostos rompendo ou até desestruturando as membranas e agindo sobre compostos lipofílicos causando a perda de enzimas e nutrientes da membrana

celular bacteriana por sua capacidade de agir na parede celular dos mesmos dissolvendo a parte lipofílica.

5. CONCLUSÕES

A espécie *Ocotea nutans*, pertencente à família Lauraceae, não apresenta descrição na literatura sobre sua composição fitoquímica ou qualquer outro estudo descritivo desse cunho. Em uma pesquisa fitoquímica preliminar por CCD, esta espécie evidenciou a presença de grupos de metabólitos secundários como: alcaloides, flavonoides, esteroides, terpenos, cumarinas e taninos.

A descrição morfoanatômica e testes histoquímicos de *Ocotea nutans* foram importantes para a caracterização e correta identificação desta, sendo descritos pela primeira vez nesta espécie.

Em análise cromatográfica (CG/EM) do óleo essencial extraído das folhas de *Ocotea nutans* identificou-se a presença majoritária dos componentes biciclogermacreno, D-germacreno, bisabol-11-ol, estabelecendo também o rendimento do óleo essencial da espécie.

O ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* apresentou níveis de toxicidade significativos nos extratos brutos cetônicos, frações e óleo essencial, ficando somente as frações residuais fora da classificação de toxicidade. Merecem destaque o extrato bruto da folha, fração hexânica do caule e o óleo essencial por se enquadrarem em altamente tóxica e por possivelmente possuírem potencial para atividades biológicas que demandem componentes tóxicos.

O ensaio hemolítico *in vitro* evidenciou maiores níveis de hemólise nas concentrações de 1000 µL do extrato bruto da folha e fração hexânica da folha. E um nível de hemólise acima do controle no óleo essencial, onde todas as concentrações apresentaram potencial hemolítico.

A avaliação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana indicou que a fração hexano do caule apresentou o maior potencial inibitório sobre a bactéria *E. faecalis* e *E. coli*, e o extrato bruto do caule apresentou menor CIM para a bactéria *E. faecalis* por meio da metodologia de microdiluição em caldo.

Tendo em vista os resultados obtidos nos ensaios realizados, mostra-se de suma importância a continuidade dos estudos para o isolamento e

identificação dos compostos responsáveis por tais atividades nos extratos, com destaque para as frações que mostraram um desempenho significativo tóxico e também as frações que não apresentaram potencial tóxico que podem possuir outra atividade biológica ou farmacológica relevante.

Este trabalho contribuiu para o enriquecimento dos dados a respeito da espécie *Ocotea nutans* (Nees) Mez que anteriormente se limitava ao levantamento botânico, além de revelar atividades interessantes que necessitam de estudos complementares.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography mass spectroscopy**. 4.ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 804p, 2007.
- ADWAN, D. & MHANNA, M. Synergistic Effects of Plant Extracts and Antibiotics on *Staphylococcus aureus*. Strains Isolated from Clinical Specimens. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 3, n. 3, p. 134-139, 2008.
- ALMEIDA, R. B. M.; BRANCO, A.; BOTURA, M. B. **Avaliação *in vitro* da atividade anticolinesterásica de extratos de *Ocotea daphnifolia***. Trabalho apresentado no X simpósio Brasileiro de Farmacognosia, Juazeiro, 2015.
- AMARAL, P. de A.; NEVES, G.; FARIAS, F.; EIFLER-LIMA, V. L. Química combinatória: moderna ferramenta para a obtenção de candidatos a protótipos de novos fármacos. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**. vol.39, n.4, 2003.
- AMARAL, J. F.; SILVA, M. I. G.; AQUINO-NETO, M. R.; TEIXEIRA-NETO, P. F.; MOURA, B. A.; MELO, C. T. V. de; ARAUJO, F. L. O. de; SOUSA, D. P. de; VASCONCELOS, P. F. de; VASCONCELOS, S. M. M. de; SOUSA, F. C. F. de. Antinociceptive Effect of the Monoterpene R-(d)-Limonene in Mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n.7, p. 1217-1220, 2007.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. 2. ed. rev. atu. Viçosa: UFV, 438p, 2006.
- ARAÚJO, A. J. **Etudo fitoquímico das folhas de *Ocotea puberula* (Reich) Nees (LAURACEAE)**. Curitiba, 2000. 110f. Dissertação (Mestrado em Química) – Setor de Ciências Exatas – Universidade Federal do Paraná
- ARAÚJO, A. C. R. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopática, antio xidante, antilarvícida e citotóxica das folhas de *Ocotea pulchella* Mart. (lauraceae)**. Curitiba, 2012. 118f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências Saúde – Universidade Federal do Paraná
- AYRES, M. C. B. et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 90-97, Jan/Mar 2008.
- BALLABENI, V.; TOGNOLINI, M.; BERTONI, S.; BRUNI, R.; GUERRINI, A.; RUEDA, G. M.; BAROCELLI, E. Antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from wild *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) calices from Amazonian Ecuador. **Pharmacological Research**, v.55, n.1, p. 23-30, 2007.

BALLABENI, V.; TOGNOLINI, M.; GIORGIO, C.; BERTONI, C.; BRUNI, R.; BAROCELLI, E. *Ocotea quixos* Lam. essential oil: In vitro and in vivo investigation on its anti-inflammatory properties. **Fitoterapia**, Volume 81, n.4, p.289-295, 2010.

BARBOSA-FILHO, J. M.; MORAIS, L. C. S. L.; ALMEIDA, R. N.; CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S. *Ocotea duckei*: Exceptional Source of Yangambin and Other Furofuran Lignans **Anais Academia Brasileira Ciências**, v. 71, n. 2, p. 231, 1999.

BARBOSA-FILHO, J. M.; CUNHA, R. M.; DIAS, C. S.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A.; MEDEIROS, I. A. GC-MS analysis and cardiovascular activity of the essential oil of *Ocotea duckei*. **Revista Brasileira Farmacognosia**, vol.18, n.1, pp. 37-41, 2008.

BARRERA, E. D. B.; SUAREZ, L. E. C. In vitro anti-inflammatory effects of naturally-occurring compounds from two Lauraceae plants. **Anais Academia Brasileira de Ciências**, vol.83, n.4, pp. 1397-1402, 2011.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, v.1, 1976.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B.; HESS, S. C.; MESSANA, I.; FERRARI, F.; YUNES, R. A. Study of the antinociceptive action of the ethanolic extract and the triterpene 24-hydroxytormentonic acid isolated from the stem bark of *Ocotea suaveolens*. **Planta Médica**, v.65, n.1, p. 50-55, 1999.

BERLYN, G. P.; MIKSCH, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University, 1976.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BRAGA, T. V.; OLIVEIRA, T. T.; PINTO, J. T.; DORES, R. G. R.; NAGEM, T. J. Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de *Cissus verticillata* (L.) e avaliação do processo de secagem em estufa com ventilação forçada. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 287-290, 2007.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D. ; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v.33, n.6, 1359-1369, 2010.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5 ed. Volume 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA. 2010.

BRASIL, ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília, 2013.

BROTTO, M. L.; CERVI, A. C.; DOS SANTOS, E. P. O gênero *Ocotea* (Lauraceae) no estado do Paraná, Brasil. **Rodriguésia**, v. 64, n.3, p. 495-525, 2013.

BRUNI, R.; MEDICI, A.; ANDREOTTI, E.; FANTIN, C.; MUZZOLI, M.; DEHESA, M.; ROMAGNOLI, C.; SACCHETTI, G. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. **Food Chemistry**, v. 85, n.3, p. 415-421, 2004.

BULOW N.; KONIG, W. A. The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosyntheses: investigations of a acid catalyzed, photochemically, and thermally induced rearrangements. **Phytochemistry**, v.55, n.2, p.141-168, 2000.

CANSIAN, R. L.; MOSSI, A. J.; PAROUL, N.; TONIAZZO, G.; ZBORALSKI, F.; PRICHOA, F. C.; KUBIAK, G. B.; LERIN, L. A. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (VELL.) ROWHER). **Perspectiva**, Erechim, v. 34, n. 127, p. 123-133, 2010.

CAMARGO, M. J.; MIRANDA, M. L. D.; KAGAMIDA, C. M.; RODRIGUES, E. D.; GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S. Sesquiterpenos de *Ocotea lancifolia* (Lauraceae). **Química Nova**, v.36, n.7, p. 1008-1013, 2013.

CARMO, F.M. da S.; BORGES, E. E. de L.; TAKAKI, M. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). **Acta Botanica Brasilica**, v.21, n.3, p. 697-705, 2007.

CARVALHO, J. L. C. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico do *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae**. Curitiba, 2001. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Paraná.

CARVALHO, J.L.S.; CUNICO, M. M.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.. Termoequilíbrio de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae por sistema Soxhlet modificado. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1031-1035, 2009.

CASTELLANI, D. C.; CASALI, V. W. D.; SOUZA, A. L.; CECON, P. R.; CARDOSO, C. A.; MARQUES, V.B. Produção de óleo essencial em canela (*Ocotea odorifera* Vell.) e guaçatonga (*Casea sylvestris* Swartz) em função da época de colheita. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.8, n.4, p.104-107, 2006.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química nova**, v.21, n.1, p.99-105, 1998.

CONSTANTIN, M. B.; SARTORELLI P.; LIMBERGER, R.; HENRIQUES, A. T.; STEPPE M.; FERREIRA, M. J. P.; OHARA, M. T.; EMERENCIANO, V. P.; KATO M. J. Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: antimicrobial activities and analysis by CG/MS and C-NMR. **Planta Medica**, v. 63, p. 771-773, 2001.

COUTINHO, D. F., AGRA, M. F., BASILIO, I. J. L. D., BARBOSA-FILHO, J. M. Morphoanatomical study of the leaves of *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae-Lauroideae). **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.16, n. 4, p. 537-544, 2006a.

COUTINHO, D. F., AGRA, M. F., BARBOSA-FILHO, J. M., BASILIO, I. J. L. D Morfo-anatomia foliar de *Ocotea gardneri* (Meisn.) Mez (Lauraceae-Lauroideae). **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.16, n. 4, p. 178-184, 2006b.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p.564-582. 1999.

CRONQUIST, A. The evolution and classification of flowering plants. 2º ed. **New York Botanical Garden**, 555 p. 1998.

CROWELL, P. Monoterpenes in breast câncer chemoprevention. **Breast Cancer Research and treatment**, v. 46, p. 191-197, 1997.

CUCA, L. E.; LEON, P.; COY, E.D. A bicyclo(3.2,1) octanoid neolignan and toxicity of the ethanol extract from the fruit of *Ocotea heterochroma*. **Chemistry of Natural Compounds**, vol.45, n.2, p.179-18, 2009.

DARRA, E.; ABDEL-AZEIM, S.; MANARA, A.; SHOJI, K.; MARECHAL, J. D.; MARIOTTO, S.; CAVALIERI, E.; PIZZA, C.; PERAHIA, D.; CRIMI, M.; SUZUKI, H. Insight into the apoptosis-inducing action of α -bisabolol towards malignant tumor cells: Involvement of lipid rafts and Bid. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.476, n.2, p.113–123, 2008

DEUSCHLE, R.A.N.; CAMARGO, T.; ALVES, S.H.; MALLMANN, C.A.; HEINZMANN, B.M. Fracionamento do extrato diclorometânico de *Senecio*

desiderabilis Vellozo e avaliação da atividade antimicrobiana. **Revista Brasileira Farmacognonia**, v.17, n.2, p.71-75, 2007.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic approach**. 2 ed editora John Willey & sons, LTD. 2002.

DIAS, C. S.; SILVA, I. G.; CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S.; BRAZ-FILHO, R.; BARBOSA FILHO, J. M. Isolamento e identificação de novos alcalóides de *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae). **Revista Brasileira Farmacognosia**. v.13, ed. 1, p. 62-63, 2003.

DORES, R. G. R. **Histoquímica de *Dimorphandra mollis* Benth.** 2007. 136f. Tese (Doutorado), Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

DUNCAN, D B. Multiple range and multiple *F* testes. **Biometrics**, v.11, p 1-42, 1955.

FARAGO, P. V.; BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R., NAKASHIMA, T. Análise morfoanatômica de folhas de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees, Lauraceae. **Revista Brasileira Farmacognosia**. vol.15, n.3, p.250-255, 2005.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/ Ed. da UFSC, 2003. p. 263-288.

FINNEY, D.J. **Probit Analysis**. Cambridge: Cambridge University Press, 1956

FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**. 2. ed. Princeton: D. Van Nostrand, 1949.

FRANCO, Y. O.; FRANCO, L. M. Biotransformação: importância e toxicidade. **Saúde em Revista**. v.5, n.9, p. 69-76, 2003.

FRANCESCATO, L.N. **Constituintes de *Senecio heterotrichus* DC.: Isolamento, elucidação estrutural, derivatizações e avaliação da atividade antimicrobiana; estudo dos constituintes voláteis de outras espécies de *Senecio***. Santa Maria, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria. GARCEZ, W. S.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Benzylisoquinoline alkaloids and flavonols from *Ocotea vellosiana*. **Phytochemistry**, v.39, n.4, p.815-816, 1995.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; SILVA, L. M. G. E.; SHIMABUKURO, A. A. Indole alkaloid and other constituents from *Ocotea minarum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol.16, n.6b, pp.1382-1386, 2005.

GARCEZ, F. R.; SILVA, A. G. F.; GARCEZ, W. S.; LINCK, G.; MATOS, M. C. F.; SANTOS, E. C. S.; QUEIROZ, L. M. M. Cytotoxic Aporphine Alkaloids from *Ocotea acutifolia*. **Planta Médica**, v.77, n.4, p. 383-387, 2011

GARRETT, R.; CRUZ, A. S. R.; GUERRA, M. S; GATTUSO, M.; ROCHA, L. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Ocotea notata* guiada pelo ensaio de toxicidade sobre artemia salina. **Boletín Latinoamericano y del Caribe Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.6, n.6 p. 344–345, 2007.

GARRETT, R.; ROMANOS, M. T. V.; BORGES, R. M.; SANTOS, M. G.; ROCHA, L.; SILVA, A. J. R. da. Antiherpetic activity of a flavonoid fraction from *Ocotea notata* leaves. **Revista Brasileira Farmacognosia**, vol.22, n.2, p. 306-313, 2012.

GARRETT, R.; CRUZ, A. S. R.; ROCHA, L.; SANTOS, M. G; SILVA, A. J. S. Chemical Composition and Toxicity of *Ocotea notata* (Nees) Mez Essential Oil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 13, n.4, p. 455-459, 2013.

GERSBACH, P. V. REDDY, N. Non-invasive localization of thymol accumulation in *Carum copticum* (Apiaceae) fruits by chemical shift selective magnetic resonance imaging. **Annals of Botany**, v.90, p. 253-257, 2002.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estududos avançados**, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular aspects of Medicine**, v.27, n.1, p.1-93, 2006.

GUTERRES, Z. da R.; SILVA, A. F. G.; CAMARGO, M. J.; NOGUEIRA, C. R.; GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; SPANO, M. A. Atividade genotóxica de extratos etanólicos de plantas do gênero *Ocotea*. **Revista Brasileira Biociências**, Porto Alegre, v. 10, n. 2, p. 157-163, 2012.

GUTERRES, Z. R.; SILVA, A. F. G.; GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; FERNANDES, C. A.; GARCEZ, F. R. Mutagenicity and recombination of *Ocotea acutifolia* (Lauraceae) aporphinoid alkaloids. **Mutation Research**, v.757, n.1, p. 91-96, 2013.

HIROTA, R.; ROGER, N. N; I NAKAMURA, H.; SONG, H-S.; MASAYOSHI SAWAMURA, M.; SUGANUMA, N. Anti-inflammatory Effects of Limonene from Yuzu (*Citrus junos* Tanaka) Essential Oil on Eosinophils. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 3, 2010.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk

medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw Hill Book, 1940.

JUNIOR, A. R. P.; CARVALHO, R. I. N. DE; NETTO, S. P.; WEBER, S. H.; SOUZA, E. DE; FURIATTI, R.S. Bioatividade de óleos essenciais de sassafrás e eucalipto em cascudinho. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 3, p. 637-643, Mar. 2010

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Edur, 1997. 198 p.

KOSEKI, P. M.; VILLAVICENCIO, A. L. C. H.; BRITO, M. S.; NAHME, L. C.; SEBASTIÃO, K. I.; RELA, P. R.; MURADIAN, L. B. A.; MANCINI-FILHO, J.; FREITAS, P. C. D.. Effects of irradiation in medicinal and eatable herbs. **Radiation Physical Chemistry**, v. 63, p. 681-684, 2002.

LEWAN, L.; ANDERSSON, M.; MORALES, P.G. The use of *Artemia salina* in toxicity test. **Alternatives to laboratory animals ATLA**, v. 20, p. 297-301, 1992.

LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BESSIÈRE, JEAN-MARIE. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Química Nova**. v. 27, n.6, São Paulo, Nov./Dec., 2004.

LUGO, M. C. R. **Metabolitos secundários aislados de hojas de *Ocotea heterochroma* (Lauraceae)**. Colômbia, 2015. Tese (Mestrado em Ciencias Químicas) – Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., E. V. F.; GRYNBERG, N .F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p.429-438, 2002.

MARTIN, N. 2015. BLOG PLANETA NELI. *Artemia salina* (parte II). Não paginado. Disponível em: <<http://www.planeta-neli.es/index.php/2015/10/20/artemia-salina-parte-ii/>> Acesso em: 15/06/2016.

MARQUES, A. C. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, v.1, p.195-206, 2001.

METCALFE, C. R; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledones: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. Oxford: Clarendon Press, v.2, 1972.. v.1., 1979.

METCALFE, C. R. **Anatomy of the dicotyledons Magnoliales, Illiciales, and Laurales**. 2ed. Clarendon Press, Oxford. v. 3. 224 p. 1987.

MEYER, B. N., *et al.* Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant

constituents. **Planta Médica**, v.45, p.31-34, 1982.

MEZ, C. C. Lauraceae Americanae. **Jahrbuch des Königlichen botanischen Gartens und des botanischen Museums zu Berlin**. v.5, p.1-556, 1889

MICHELIN, D.C.; MORESCHI, P.E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; CHAUD, M.V.; PAGANELLI, M.O. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira Farmacognosia** v. 15, p. 316-320, 2005.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. 2ed São Paulo: Tecmedd, 2004.

MIGUEL, O. G. **Ensaio sistemático de análise fitoquímica**. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2003.

MIGUEL, O. G. “**Processo de obtenção de extratos hidroalcoólicos, extratos secos e derivados do agrião (Nasturtium officinale) e espécies medicinais afins, com modificações introduzidas em equipamento soxhlet para aplicações na indústria, área farmacêutica, cosmética, alimentícias e afins**”. PI 06017063-7 A2, 05 Apr. 2006, 11 Dec. 2007

MIGUEL, O. G. et al. “**Identificação da propriedade antinociceptiva (analgésica) do alcalóide aporfínico S - (+) – dicentrina e usos do mesmo**”. BR 102014016339-5 A2, 24 Jun. 2014, 01 Jul. 2014.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. DE L. Taninos: Uma Abordagem da Química à ecologia. **Química nova**, v. 28, n. 5, p. 892–896, 2005.

MORAIS, S.M., *et al.* Antioxidant activity of essential oils from Northeastern Brazilian Croton species. **Química Nova**, v. 29, p. 907-910, 2006.

MULYANINGSIH, S.; SPORER, F.; REICHLING, J.; WINK, M. Antibacterial activity of essential oils from Eucalyptus and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 9, p. 893-9, 2011.

MURALI, R.; SARAVANAN, R. Antidiabetic effect of d-limonene, a monoterpene in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 2, n. 4, p. 269–275, 2012.

MURRAY, P. R.; **Manual of Clinical Microbiology**, 7th ed., ASM Press: Washington, 1999.

NAKATA, P. A. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. **Plant Science**, v. 164, p. 901-909, 2003.

NEGI, B. S.; DAVE, B. P. Evaluation of in vitro antimicrobial activity from the leaves extract of *Cassia fistula* Linn. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 4, p. 557-564, 2010.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1991.

PABON, L. C.; CUCA, L. E. Aporphine alkaloids from *Ocotea macrophylla* (Lauraceae). **Química Nova**, vol.33, n.4, p.875-879, 2010.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry, theoretical and applied**. London:Churchill. 1960. 998 p

POSER, G. L.; MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ed. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, 2007.

PRIETO, J. A.; PABON, L. C.; PATIÑO, O. J.; DELGADO, W. A.; CUCA, L. E. Constituyentes químicos, actividad insecticida y antifúngica de los aceites esenciales de hojas de dos especies Colombianas del género *Ocotea* (LAURACEAE) **Revista Colombiana de Química**, vol. 39, n.2, p.199-209, 2010.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, vol.30, n.6, p.1446-1455, 2007.

QUINTA; A. T. Novo material de apoio para cortes histológicos. **Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária da Universidade do Rio Grande do Sul**, v. 6, p. 51-53, 1963.

RIBEIRO, R.A.; CARMO, L.G.; VLADIMIROVA, J.; JURKIEWICZ, N.H.; JURKIEWICZ, A. Nantenine block muscle contraction and Ca²⁺ transient induced by noradrenaline and K⁺ in rat vas deferens. **European Journal of Pharmacology**. n.470, p. 37-43, 2003.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology**. Ed Premier, 1997

RODRIGUEZ, J. A. P. **Estudo fitoquímico de *Compsonura capitellata* (Myristicaceae), *Zanthoxylum rigidum* (Rutaceae) y *Ocotea longifolia* (Lauraceae) y evaluación de su posible aplicación como biocontroladores de *Sitophilus sp.* *Dorstenia***. Colômbia, 2012. Tese (Doutorado em Ciencias Químicas) – Departamento de Química, Universidad Nacional d Colombia.

ROESER, K. R. Die Nadel der Schwarzkiefer-Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**, v. 61, n.2, p. 33-36, 1972.

ROGATTO, J. M.; FERREIRA, M. C. C.; ONO, R. M.; CARVALHO, L. C.; SOARES, D. F.; VIEIRA, D. C. M.; CHAVASCO, J. K. Caracterização do potencial antimicrobiano de *Ocotea odorífera* (Vellozo) Rohwer. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 12, n. 1, p. 886-894, jan./jul. 2014

ROZZA, A. L.; MORAES, T. de M.; KUSHIMA, H.; TANIMOTO, A.; MARQUES, M. O. M.; BAUAB, T. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; PELLIZZON, C. H. Gastroprotective mechanisms of Citrus lemon (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and -pinene: Involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E2. **Chemico-Biological Interactions**, n. 189, p. 82–89, 2011.

SANTOS, A. O. et al. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 3, p. 277-281, Mai 2008.

SARAIVA, R. M. C. **Atividade antibacteriana de plantas medicinais frente à bactérias multirresistentes e a sua interação com drogas antimicrobianas**. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal Pará, Belém, 2012.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2 ed. Ames: Iowa State College, 1951.

SCALCO, N.; LADEIRA, A. M.; LAGO, J. H. G.; YOUNG, M. C. M.; CARVALHO, L. R. Avaliação de atividade fungitóxica e isolamento de aloaromadendrano - 4 α , 10 β - diol em *Hypericum cordatum*. **Revista Brasileira Plantas Medicinais** v. 16, n.3, p.744-749, 2014.

SILVA, T. S. S. **Estudo de tratabilidade físico-química com uso de taninos vegetais em água de abastecimento e de esgoto**. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, p.10- 17, 1999.

SILVA, F. M.; AQUILA, M. E. A. Contribuição ao estudo do potencial alelopático de espécies nativas. **Revista Árvore**, v.30, n.4, p.547-555, 2006.

SILVA, L.; ONIKI, G. H.; AGRIPINO, D. G.; MORENO, P. R. H.; YOUNG, M. C. M., MAYWORM, M. A. S.; LADEIRA, A. M. Bicyclogermacreno, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae). **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 17 n. 3, p. 361-367, 2007.

SILVA, L. M. G. E. **Estudo químico biomonitorado por ensaio com larvas de *Aedes Aegypti* das espécies *Ocotea velloziana* (Meisn.) Mez e *Aiouea trinervis* (Meisn.)**. 110 f. Tese (Doutorado em Saúde e Desenvolvimento na

Região Centro-Oeste), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2010.

SILVA, L. L.; SILVA, D. T.; GARLET, Q. I.; CUNHA, M. A.; MALLMANN, B. B.; LONGHI, S. J.; PEREIRA, A. M. S.; HEINZMANN Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Neotropical ichthyology**, Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 443-451, 2013

SOLEREDER, H. (1908). Laurinae. In: **Systematic anatomy of the dicotyledons**. Oxford, Clarendo Press. Vol. II. 702-706.

SOUSA, E. O.; BARRETO, F. S.; RODRIGUES, F. F. G.; COSTA, J. G. M. Atividade antibacteriana e interferência de *Lantana camara* L. e *Lantana montevidensis* (Spreng.) Briq. na resistência de aminoglicosídeos. **Revista Brasileira Biociências**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2011

SYLVESTRE, M.; PICHETTE, A.; LONGTIN, A.; NAGAU, F.; LEGAULT, J. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n.1, 3, p. 99-102, 2006.

TANAKA, J. C. A. S. et al. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 834-837, Jul 2005.

TOYOTA, M.; KOYAMA, H.; MIZUTANI, A. Y. (-)- Ent-spathulenol isolated from liverworts is a artefact. **Phytochemistry**, v.41, p.1347-1350, 1996.

TROPICOS. Missouri Botanical Garden. Disponível em:
<<http://www.tropicos.org/Name/17800281>> Acesso em: 01/07/2016

VALTER, J. L.; ALENCAR, K. M. C., SARTORI, A L. B., NASCIMENTO, E. A., CHANG, R., MORAIS, S. A. L. de; LAURA, V. A., YOSHIDA, N. C., CAROLLO, C. A., SILVA, D. B. da, GRASSI, R. F., FABRI, J. R., SIQUEIRA, J. M. Variação química no óleo essencial das folhas de seis indivíduos de *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p. 373-378, 2008.

VEIGA, L. F.; VITAL, N. **Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia* sp.** In: I. A. Nascimento, E. C. P. M., Sousa & M. Nipper (ed.), Métodos em ecotoxicologia marinha. Aplicações no Brasil. Artes Gráficas e Indústria, São Paulo, p.111-122, 2002.

VEIGA JUNIOR, V. F. E.; PINTO, A. C. O. GÊNERO *Copaifera* L. **Química Nova**, v, 25, n, 2, p, 273-286, 2002.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, vol.28, n.3, p.519-528, 2005.

YAMAGUCHI, K. K. de L.; ALCANTARA, J. M.; VEIGA JUNIOR, V. F.
Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de 20 espécies da família Lauraceae. **Acta Amazonica**, vol.42, n.4, p. 541-546, 2012.

ZANIN, S. M. W.; LORDELLO, A. L. L.. Alcalóides aporfinóides do gênero Ocotea (Lauraceae). **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 92-98, 2007.

ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, O. G.; MONTRUCCHIO, D. P.; COSTA, C. K.; LAGOS, J. B.; LORDELLO, A. L. L. Mudanças de Ocotea puberula (Lauraceae): identificação e monitoramento de alcalóides aporfinóides. **Química Nova**, v.34, n.5, p. 743-747, 2011.

ZHOU, B. N.; JOHNSON, R. K.; MATTERN, M. R; WANG, X.; HECHT, S. M.; BECK, H. T.; ORTIZ, A; KINGSTON, D. G. Isolation and biochemical characterization of a new topoisomerase I inhibitor from Ocotea leucoxydon. **Journal of Natural Products**, vol.63, n.2, p.217-21, 2000.

ANEXO 1

AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS

**AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO
GENÉTICO REALIZADA DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO CGEN Nº35,
DE 27 DE ABRIL DE 2011
Nº 03/2014**

O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 40, de 24 de setembro de 2003, para autorizar instituição nacional, pública ou privada, que exerça atividade de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, **autoriza** com amparo na Resolução CGEN nº 35, de 27 de abril de 2011, que dispõe sobre regularização de atividades de acesso ao patrimônio genético e/ou ao conhecimento tradicional associado e sua exploração econômica realizadas em desacordo com a Medida Provisória no 2.186-16, de 23 de agosto de 2001 e demais normas, **as atividades de acesso ao patrimônio genético desenvolvidas pela:**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, CNPJ/MF nº. 75.095.679/0001-49, situada na Rua XV de Novembro, 1299, Curitiba-PR, CEP: 80060-000, e representada na pessoa do Reitor Zaki Akel Sobrinho, RG nº. 1.439.536-9 SSP/PR, CPF nº. 359.063.759-53, no âmbito das atividades do projeto de pesquisa "*Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais*".

Objetivo da Autorização: Avaliar sob aspecto morfoanatômico, químico e biológico das espécies acessadas constantes do projeto de pesquisa.

Período das atividades: 2000 a 2019.

Validade da Autorização: Cinco anos, contados da assinatura. Em razão da continuidade do projeto de pesquisa, a instituição detentora desta autorização deverá enviar ao Ibama, a partir da emissão da licença, **relatório anual** sobre a execução das atividades de pesquisa, nos termos do Decreto nº 4.946/2003 e Resolução CGEN nº 41/2013. Endereço para envio do relatório: IBAMA/DBFLO, SCEN L4 Norte, Bloco B, Brasília-DF, CEP: 70818-900.

Esta autorização das atividades de acesso está vinculada às informações e termos assinados pelo requerente, constantes do processo nº 02001.001165/2013-47.

Brasília, 17 de março de 2014.

Volney Zanardi Junior
Presidente